

**Analysen zur Assemblierung von Centromeren und
PML-Kernkörperchen in lebenden Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Biologin Stefanie Weidtkamp-Peters,
geboren am 24. Dezember 1974 in Moers

- 1. Gutachter:** PD. Dr. P. Hemmerich
Fritz-Lipmann-Institut für Altersforschung,
Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 2. Gutachter:** Prof. Dr. S. Diekmann
Fritz-Lipmann-Institut für Altersforschung,
Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 3. Gutachter:** Prof. Dr. H. Will
Heinrich-Pette-Institut für Experimentelle Virologie und
Immunologie an der Universität Hamburg
- Eingereicht:** 10. November 2006
- Rigorosum:** 9. Januar 2007
- Disputation:** 22. Januar 2007

für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Centromere	5
1.2 PML-Kernkörperchen	8
1.3 Das Protein PML	10
1.4 PML-Kernkörperchen und DNA-Reparatur	11
1.5 Kinetische Mikroskopie	13
1.5.1 FRAP: Mobilitätsmessungen von Proteinen an zellulären Strukturen	15
1.5.2 FCS: Dynamisches Verhalten von Proteinen im Nukleoplasma	17
1.6 Ziel der Arbeit	20
2 Material	22
2.1 Reagenzien	22
2.2 Software zur Bildaufnahme, Bildverarbeitung und Datenkalkulation	22
2.3 Verwendete Zelllinien	22
2.4 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe	23
2.4.1 Primäre Antikörper	23
2.4.2 Sekundäre Antikörper, DNA-Farbstoff und Mounting	23
2.5 Plasmide	24
3 Methoden	27
3.1 Zellkultur und Transfektion von Zellen	27
3.1.1 Zellkultur eukaryotischer Zellen	27
3.1.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen	27
3.2 Induktion von DNA-Schäden	28
3.2.1 UV-A-Mikrostrahl	28
3.2.2 γ -Bestrahlung	28
3.3 Colony Forming Assay	29
3.4 Western Blot	30
3.4.1 Herstellung von Zelllysaten	30
3.4.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	30
3.4.3 Immunblot	31
3.5 Indirekte Immunfluoreszenz	32
3.6 Konfokale Mikroskopie	33
3.7 Lebendzellbeobachtungen	34
3.8 FRAP-Messungen	34
3.8.1 Praktische Durchführung der FRAP-Messungen	34
3.8.2 Quantitative Auswertung der FRAP-Messungen	36
3.9 FCS-Messungen	37
3.9.1 Praktische Durchführung der FCS-Experimente	37
3.9.2 Auswertung der Autokorrelationskurven	37
4 Ergebnisse	39
4.1 Das dynamische Verhalten der Proteine des inneren Kinetochors während der Interphase und Mitose	39
4.1.1 Charakterisierung der EGFP-Fusionsproteine des inneren Kinetochors nach subnukleärer Lokalisation und Expressionslänge	40
4.1.2 Mobilität der EGFP-Fusionsproteine des inneren Kinetochors	43
4.2 Das dynamische Verhalten der nukleären Isoformen des PML-Proteins, PML-I bis PML-VI	58

4.2.1	Charakterisierung der EGFP-Fusionsproteine EGFP-PML-I bis EGFP-PML-VI nach der Expressionslänge	58
4.2.2	Charakterisierung der EGFP-Fusionsproteine EGFP-PML-I bis EGFP-PML-VI nach ihrer Lokalisation im Zellkern	59
4.2.3	Mobilität der EGFP-Fusionsproteine der PML-Isoformen PML-I bis –VI an den PML-Kernkörperchen und im Nukleoplasma	61
4.3	Dynamik von PML-Kernkörperchen bei der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur	67
4.3.1	Lokalisation von γ -H2AX-Foci und PML-Kernkörperchen nach ionisierender Bestrahlung	67
4.3.2	Vergleich der γ -H2AX-Kinetik und Überlebensrate in den Zelllinien U2OS und WI38	71
4.3.3	Topologie von PML-Kernkörperchen, DSBs und dem DNA-Reparaturprotein NBS1 nach Applikation von DNA-Schäden mit einem UV-A-Mikrostrahl	74
4.3.4	Lokalisation des DNA-Reparaturproteins NBS1 an den PML-Kernkörperchen	75
5	Diskussion	79
5.1	Assemblierung des inneren Kinetochors	80
5.1.1	Die inneren Kinetochorproteine bilden eine stabile Basis am Centromer	80
5.1.2	Die Mobilität von Kinetochorproteinen außerhalb der Centromere beruht auf anomaler Diffusion	83
5.1.3	Die Immobilisierung von hMis12 während der Mitose	84
5.1.4	Stabile Bindung als Erweiterung des Konzeptes der nukleären Dynamik	86
5.2	Mobilität von PML im Zellkern	87
5.2.1	Lokalisation von EGFP-PML-I bis –VI an PML-Kernkörperchen	88
5.2.2	Individuelle Austauschraten von Isoformen als Grundlage für eine dynamische Struktur und Funktion von PML-Kernkörperchen	89
5.3	PML-Kernkörperchen und DNA-Reparatur	92
5.4	Ausblick	95
	Literaturverzeichnis	97
	Anhang	111
	Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	
	Veröffentlichungen	
	Lebenslauf	
	Selbstständigkeitserklärung	
	Danksagung	

Zusammenfassung

Essenzielle Funktionen im eukaryotischen Zellkern wie RNA-Transkription, DNA-Replikation und DNA-Reparatur werden von makromolekularen Proteinkomplexen bewerkstelligt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Einblicke in die Formation und Funktion von zwei sehr unterschiedlichen Mutiproteinkomplexen zu gewinnen: des Centromer-/Kinetochorkomplexes und der so genannten PML-Kernkörperchen (PML: Promyelozytische Leukämie). Dazu wurde die Mobilität von sechs Kinetochorproteinen und sechs PML-Proteinisoformen mit Hilfe von Fluoreszenz-Bleichetechniken (FRAP: „fluorescence recovery after photobleaching“) und Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) in lebenden Zellen gemessen. Außerdem wurde die funktionelle Rolle von PML-Kernkörperchen bei der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur untersucht.

Fünf der sechs untersuchten Proteine des inneren Kinetochors (CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-H, und CENP-I) bilden über den kompletten Zellzyklus hinweg in die nächste Interphase hinein einen extrem stabilen Proteinkomplex am Centromer aus. Als einziges bindet das Protein hMis12 während der Interphase mit hoher Austauschrate am Centromer, wird dort aber während der Mitose komplett immobilisiert. Dies deutet auf eine induzierbare strukturelle Funktion von hMis12 am Centromer während der Zellteilung hin. FCS-Analysen ausserhalb von Centromeren belegen für alle Kinetochor-Proteine eine hohe Mobilität basierend auf anomaler Diffusion. Dieser Befund zeigt, dass die hier untersuchten Proteine als einzelne Proteine den Zellkern „scannen“, um ihre Bindestelle am Kinetochor zu finden. Diese Arbeiten identifizieren das Kinetochor als ersten Chromatin-bindenden Komplex, dessen Aufrechterhaltung nicht auf einem schnellen Austausch seiner Einzelkomponenten beruht. Die Kinetik-Daten zeigen vielmehr, dass die strukturelle Grundlage für die Funktion des Kinetochors bei der Chromosomen-Segregation in Wirbeltierzellen in der Assemblierung eines hochstabilen Proteinkomplexes am Centromer besteht.

Obwohl PML-Kernkörperchen nicht sequenzspezifisch an Chromatin binden, stehen ihre Funktionen wahrscheinlich in direktem Zusammenhang mit Transkription, Replikation und DNA-Reparatur. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die Assemblierung dieser Strukturen durch FRAP- und FCS-Messung aller bekannten Zellkern-Spleißvarianten des PML-Proteins in lebenden Zellen analysiert. PML Isoformen I, II, III, IV, und VI zeigen biphasische FRAP-Kinetiken mit Fluoreszenzhalberholzeiten zwischen 4 und 7 Minuten. Im Gegensatz dazu

tauscht PML V an Kernkörperchen langsam ($t_{1/2}$ ca. 30 min) und mit monophasischer Kinetik aus. Keine der PML-Isoformen wird an den Kernkörperchen dauerhaft immobilisiert. Ausserhalb von Kernkörperchen sind alle PML-Isoformen hochmobil, wobei ihr anomales Diffusionsverhalten auf transiente Interaktionen mit Proteinkomplexen und/oder Chromatin schließen lässt. Diese Beobachtungen unterstützen ein kinetisches Modell für PML-Kernkörperchen, in dem PML I, II, III, IV, und VI Mediatorfunktionen ausüben, während PML V eher eine Strukturkomponente von PML-Kernkörperchen darstellt.

Desweiteren konnte in dieser Arbeit durch 4-dimensionale Immunfluoreszenz-Analyse widerlegt werden, dass PML Kernkörperchen während der erfolgreichen DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur in direkten physischen Kontakt mit den geschädigten Chromatinbereichen treten. Eine räumliche Überlappung wurde lediglich zwischen PML-Kernkörperchen und irreparablen Doppelstrangbrüchen detektiert. Diese Beobachtungen zeigen, dass PML Kernkörperchen vermutlich nicht, wie vorher in der Literatur beschrieben, als lokale Foci für DNA-Doppelstrangbrüche fungieren, sondern eher eine Rolle bei Signalvermittlungen spielen, die im Zustand nicht erfolgreicher Doppelstrangbruch-Reparatur zu nachgeschalteten Prozessen, wie z.B. permanentem Zellzyklus-Arrest (Seneszenz) oder Apoptose, führen.

Durch Untersuchungen von zwei sehr unterschiedlichen Multiproteinkomplexen im Zellkern wurde das gesamte Dynamikspektrum von Proteinen beobachtet. Die Bandbreite des beobachteten Verhaltens wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit erweitert auf vollständig unbewegliche Moleküle im Zellkern. Die Dynamikmessungen erlauben neue und wichtige Rückschlüsse auf die Funktionsweise von Multiproteinkomplexen.

1 Einleitung

Eine zentrale Eigenschaft des Zellkerns einer Wirbeltierzelle ist seine morphologische und funktionelle Heterogenität, die durch das Vorhandensein distinkter nukleärer Kompartimente oder Domänen erzeugt wird (Lamond und Earnshaw, 2001). Ausgehend von der primären Sequenz des Genoms entsteht durch diese Kompartimentierung die Möglichkeit der Regulation der Genexpression auf verschiedenen Ebenen (Hemmerich und v. Mikecz, 2005). Dieser Zusammenhang wird z. B. deutlich durch die dramatischen Veränderungen der Zellkernarchitektur während der Entwicklung und Differenzierung von Organismen (Verschure, 2006).

Nukleäre Domänen sind nicht durch Membranen voneinander abgegrenzt wie die Zellkompartimente im Cytoplasma, sondern sie besitzen vielmehr eine spezifische, für jede Domäne charakteristische Proteinzusammensetzung. Im Zusammenwirken dieser Strukturen und ihrer Komponenten können die nukleären Prozesse, wie z. B. die Transkription der DNA in RNA, die Replikation der DNA, das Spleißen der RNA, die Reparatur von DNA-Schäden und die Steuerung des Zellzyklus reguliert werden. Dabei spielt der dynamische Austausch von Proteinen an den verschiedenen Multiproteinkomplexen eine entscheidende Rolle (Shav-Tal *et al.*, 2006).

Die Entwicklung von Fluoreszenztechniken, wie Photobleichen von mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP)-markierten Proteinen und Fluoreszenzkorrelations-spektroskopie, hat die Untersuchung der Mobilität von Proteinen in lebenden Zellen möglich gemacht (Misteli, 2005). Aus diesen Beobachtungen ist ein Modell der nukleären Dynamik entstanden, in dem ein ständiger Austausch von Proteinen am Chromatin (Schmiedeberg *et al.*, 2004; Kimura und Cook, 2001) und an den verschiedenen nukleären Multiproteinkomplexen (Sporbert *et al.*, 2002; Dundr *et al.*, 2004), die die unterschiedlichen Strukturen im Zellkern bilden, stattfindet. Die Verweildauern der Proteine an den unterschiedlichen Kompartimenten und Kernkörperchen liegen im Bereich von Sekunden bis Minuten, die Histone in den Nukleosomen haben Verweildauern von mehreren Stunden (Kimura und Cook, 2001). Die freien Fraktionen dieser Proteine diffundieren im nukleären Raum offensichtlich energieunabhängig und sind dabei bereit, an neue, hoch affine

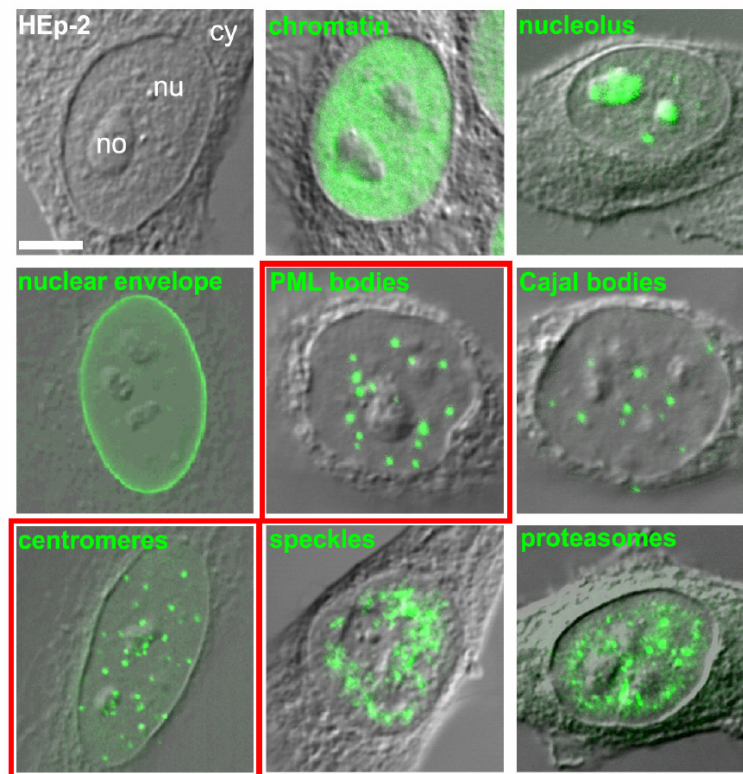


Abb. 1.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen verschiedener nukleärer Strukturen in humanen Zellen. Die rotumrandeten Bilder zeigen die PML-Kernkörperchen, bzw. die Centromere, die mit spezifischen Antikörpern angefärbt wurden. Größenbalken: 5µm. (modifiziert, nach Visions of the Nucleus, 2005)

Bindungsstellen zu binden. Dieses Modell ist auch konsistent mit der Beobachtung, dass viele Proteine in Abhängigkeit vom Status der Zelle an unterschiedlichen, nukleären Strukturen lokalisieren. Auch die Kernkörperchen selber sind dynamische Strukturen (Ogg und Lamond, 2002; Belmont 2003). Ein Grund für ihre Mobilität könnte in der Assoziation mit bestimmten Genorten sein, an denen sie eine Funktion ausüben (Smith und Lawrence, 2000; Belmont, 2003; Kießlich *et al.*, 2004).

In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Zellen höherer Eukaryoten, die mit den entsprechenden Antikörpern behandelt wurden, können verschiedene, nukleäre Strukturen in den Zellkernen sichtbar gemacht werden (Abb. 1.1). So findet man neben vielen anderen nukleären Strukturen, wie den Nukleoli, den Cajal-Kernkörperchen, den Speckles, dem Chromatin und den Proteasomen, die neben ihrer Lokalisation im Cytoplasma ebenfalls im Nukleoplasma in distinkten nukleoplasmatischen Foci lokalisiert sind, in denen proteosomale Proteolyse stattfindet (Rockel *et al.*, 2005), auch die Centromer-/Kinetochorkomplexe und die PML-Kernkörperchen, zwei nukleäre Domänen, deren strukturelle Proteinkomponenten in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihres dynamischen Verhaltens untersucht werden sollten.

1.1 Centromere

Die Centromerbereiche auf den Chromosomen sorgen während der Zellteilung für die korrekte Auftrennung der Chromosomen. Dem Centromer ist ein Multiproteinkomplex, das Kinetochor, aufgelagert (Cleveland *et al.*, 2003; Amor *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2005). Fehler bei der Aufteilung der Chromosomen in der Mitose können zu Aneuploidie, dem Tod von Zellen und schließlich zur Entstehung von Krebs führen (Cimini und Degrossi, 2005; Kops *et al.*, 2005). Trotz der fundamentalen Funktion, die der Centromer-/Kinetochorbereich bei der Zellteilung spielt, sind die Mechanismen, durch die dieser Multiproteinkomplex aufgebaut und reguliert wird, bis jetzt nur wenig verstanden (Carrol und Straight, 2006).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Centromer-/Kinetochorbereichs von Metaphase-Chromosomen zeigen eine mehrschichtige Struktur, an die außen die Mikrotubuli des Spindelapparates angeheftet sind (Abb. 1.2, rechts) und die von centromerischem Heterochromatin umrahmt wird.

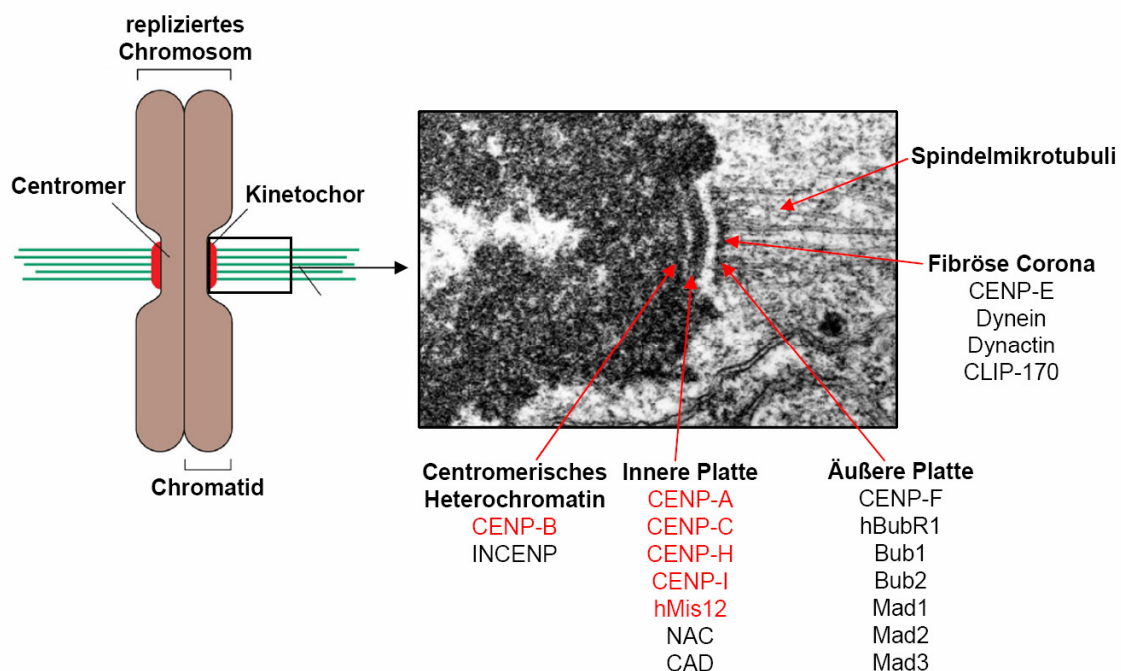


Abb. 1.2: Struktur des humanen Centromer-/Kinetochorkomplexes. Links: schematische Darstellung eines replizierten Chromosoms mit angehefteten Mikrotubuli am Centromer-/Kinetochorbereich. Rechts: elektronenmikroskopische Aufnahme des Centromer-/Kinetochorbereichs mit der Angabe der DNA- und Proteinkomponenten in den Substrukturen dieser Chromosomen-Region. Rote Schrift: Proteine des inneren Kinetochors. (modifiziert, nach Alberts, 2002)

Die inneren Kinetochorproteine CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-H, CENP-I und hMis12 sind während des gesamten Zellzyklus am Centromer lokalisiert. Mit der Ausnahme von CENP-B findet man diese „foundation kinetochore proteins“ an allen aktiven Centromeren, einschließlich der Neocentromere (van Hooser *et al.*, 2001; Amor *et al.*, 2004). RNA-Interferenz-Experimente, in denen die Proteine des inneren Kinetochors depletiert wurden, führten zu Chromosomenfehlverteilungen und einem gestörten Ablauf der Mitose (Liu *et al.*, 2006).

Das Protein CENP-A ersetzt im Bereich des centromerischen Heterochromatins in einem Teil der Nukleosomen das Histon H3 (Sullivan *et al.*, 1994). Diese speziellen Nukleosomen bilden so die Grundeinheit des centromerischen Chromatins. CENP-A spielt beim Aufbau des Kinetochors eine fundamentale Rolle. Die Depletion von CENP-A führt dazu, dass die meisten anderen Centromerproteine nicht mehr ans Kinetochor binden können (Meluh *et al.*, 1998; Howman *et al.*, 2000; Blower und Karpen, 2002). Während das Histon H3 sofort nach der Replikation der DNA in neue Nukleosomen eingebaut wird (Verreault, 2003), beobachtete man bei CENP-A einen von der Replikation unabhängigen Einbau während der G₂-Phase (Shelby *et al.*, 2000).

CENP-B ist das einzige Centromerprotein, das an eine spezifische DNA-Sequenz bindet. Es erkennt eine 17 Basenpaare lange Sequenz, die in einem Teil der α -Satelliten-DNA im Bereich des centromerischen Chromatins zu finden ist (Masumoto *et al.*, 1989). Auch wenn der Knock-out von CENP-B in Mauszellen keinen Einfluss auf die Funktion der Kinetochore zu haben scheint (Hudson *et al.*, 1998), konnte bei der Bildung artifizierlicher menschlicher Chromosomen gezeigt werden, dass die Bindung von CENP-B an die CENP-B-Box auf der DNA eine wichtige Rolle bei der Lokalisation der anderen Kinetochorkomponenten an der α -Satelliten-DNA spielt (Ohzeki *et al.*, 2002).

Das Protein CENP-C ist ein evolutionär konserviertes Protein (Tomkiel *et al.*, 1994), das direkt neben CENP-B ebenfalls an die centromerische DNA bindet, allerdings unabhängig von der DNA-Sequenz (Sugimoto *et al.*, 1994; Politi *et al.*, 2002), und direkt mit CENP-B interagiert (Suzuki *et al.*, 2004). Für die Bindung von CENP-C ist das Vorhandensein von CENP-A notwendig (Howman *et al.*, 2002). CENP-A, CENP-B und CENP-C scheinen somit durch ihre enge Interaktion grundlegend für die Ausbildung des centromerischen Chromatins zu sein.

Auch CENP-H wurde als inneres Kinetochorprotein am Centromer von Vertebraten identifiziert (Sugata, 1999; Fukagawa, 2001). Experimente in der Hühnerzelllinie DT40 mit einer funktionslosen Mutante von CENP-H haben gezeigt, dass CENP-H eine essenzielle Komponente eines aktiven Centromers ist (Fukagawa, 2001). In Säugerzellen konnte gezeigt werden, dass CENP-H am erfolgreichen Einbau von neu synthetisiertem CENP-A im Centromerbereich beteiligt ist (Okada *et al.*, 2006).

CENP-I ist das menschliche Ortholog von Mis6 bei der Spalthefe, *S. pombe*. In der Hefe wird es für die korrekte Lokalisierung von CENP-A gebraucht (Takahashi *et al.*, 2000), während gezeigt werden konnte, dass in Vertebraten die Lokalisierung von CENP-I am Centromer stark von der Präsenz von CENP-A (und auch CENP-H) abhängt (Nishihashi *et al.*, 2002). In Experimenten basierend auf der Tandem-Affinitätsaufreinigungstechnik konnte CENP-I immer mit Proteinen distal von CENP-A aufgereinigt werden, was konsistent ist mit der Beobachtung, dass CENP-I für die Bindung des äußeren Kinetochorproteins CENP-F und der Checkpoint-Proteine Mad1 und Mad2 während der Mitose notwendig ist (Liu *et al.*, 2003).

Das humane Mis12 Protein (hMis12) ist ebenfalls ein konserviertes Centromerprotein (Goshima *et al.*, 2003b). Es ist ein Teil eines Komplexes aus vier Untereinheiten und scheint eine wichtige Rolle beim Aufbau des mitotischen Kinetochors zu spielen. Die Herunterregulierung der Expression jeder der vier Untereinheiten in RNA-Interferenz-Experimenten führte zu nicht korrekt angehefteten und falsch orientierten Chromosomen in der Mitose (Kline *et al.*, 2006). Das Protein hMis12 ist das einzige konstitutive Centromerprotein, das auch mit Komponenten des pericentromerischen Chromatins, wie HP1 α und HP1 γ interagiert (Obuse *et al.*, 2004).

Neben den konstitutiven Proteinen des inneren Kinetochors binden in der Mitose zur Ausbildung eines funktionalen Kinetochors die Proteine des äußeren Kinetochors. Sie gehören z. B. den Proteinen des „Mitotic checkpoint complex“ an, oder sie sind Motorproteine, die für die Anheftung der Mikrotubuli an den Kinetochorkomplex verantwortlich sind (Amor *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2005; Henikoff und Dalal, 2005).

1.2 PML-Kernkörperchen

PML-Kernkörperchen sind nukleäre Proteinstrukturen, die man in allen Zellen höherer Eukaryoten findet. In Abhängigkeit vom Zelltyp und vom Zellzyklusstadium findet man ein bis dreißig PML-Kernkörperchen pro Zellkern. Die Form der PML-Kernkörperchen wird als kugelförmig beschrieben. Im Lichtmikroskop erscheint die Struktur ringförmig, als ob sie nur aus einer dichten Hülle besteht, die einen zentralen Innenraum umgibt, der selbst nur wenig Protein enthält (Dellaire und Bazett-Jones, 2004).

Die beiden diese Struktur definierenden Proteine sind das PML-Protein und das Protein Sp100 (Sternsdorf *et al.*, 2005). Weitere konstitutive Proteine sind die Bloom-Syndrom-Helikase BLM (Hu *et al.*, 2001), SUMO-1 („small ubiquitin like modifier“) und Daxx (Li *et al.*, 2000; Negorev und Maul, 2001). Neben diesen Proteinen gibt es eine stetig ansteigende Anzahl von Proteinen (zur Zeit mehr als 77), die ebenfalls in den PML-Kernkörperchen gefunden wurden, die aber meist nur transient mit den PML-Kernkörperchen assoziiert sind. Dazu gehören z. B. das Tumorsuppressorprotein p53 (Fogal *et al.*, 2000), das Protein HIPK2 („homeodomain interacting protein kinase 2“) (Hofmann *et al.*, 2002), CBP (Boisvert *et al.*, 2001), das Retionoblastomprotein, Rb (Alcalay *et al.*, 1998), das Heterochromatinprotein HP1 (Seeler *et al.*, 1998), und die DNA-Reparaturproteine RAD51 (Bischof *et al.*, 2001) und NBS1 (Naka *et al.*, 2002). Das in den PML-Kernkörperchen lokalisierte Protein SUMO-1 modifiziert kovalent eine Reihe der PML-Kernkörperchenkomponenten. Die Sumoylierung des PML-Proteins und seine Fähigkeit, PML nicht kovalent zu binden, sind für die Lokalisation anderer PML-Kernkörperchen-Komponenten an diesen essenziell (Zhong *et al.*, 2000) und spielt auch bei der Aufrechterhaltung der Struktur der PML-Kernkörperchen offenbar eine große Rolle (Boddy *et al.*, 1996; Shen *et al.*, 2006).

Die Funktion der PML-Kernkörperchen im Zellkern ist nach wie vor nicht geklärt. Sie werden aber mit vielen nukleären Prozessen, wie der Regulation der Transkription, DNA-Replikation, Tumorsuppression, Zellzykluskontrolle, der antiviralen Aktivität und DNA-Reparatur, in Verbindung gebracht (Abb. 1.3). Es konnte bereits gezeigt werden, dass PML-Kernkörperchen mit den Orten aktiver Transkription assoziiert sein können (Shiels *et al.*, 2001; Kießlich *et al.*, 2002) und dass sie die Transkription von Reporterplasmiden, die an PML-Kernkörperchen lokalisieren, beeinflussen (Block *et al.*, 2006).

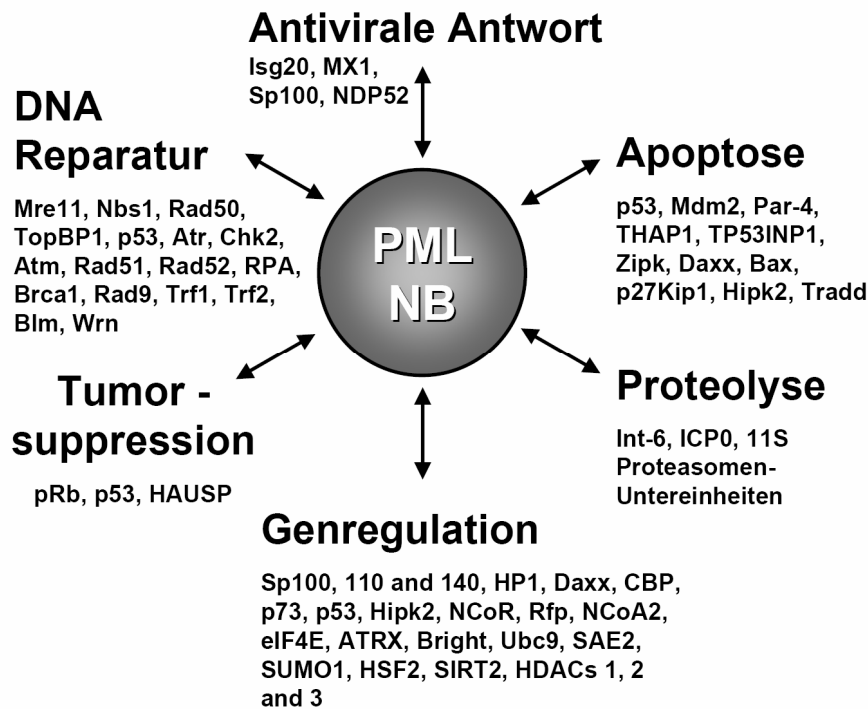


Abb. 1.3: Die Funktionen der PML-Kernkörperchen. Die Abbildung fasst die unterschiedlichen zellulären Funktionen, die mit den PML-Kernkörperchen in Verbindung gebracht werden, zusammen und gibt eine Übersicht der an diesen Prozessen beteiligten Proteine, die an PML-Kernkörperchen lokalisieren. Die Lokalisation dieser Proteine an den PML-Kernkörperchen kann temporär unter bestimmten Bedingungen, z. B. Stress, oder auch nur an einem Teil der PML-Kernkörperchen erfolgen. (modifiziert, nach: Dellaire und Bazett-Jones, 2004)

Daneben wird vermutet, dass PML-Kernkörperchen auch Speicherorte für Proteine darstellen könnten (Negorev *et al.*, 2000) und an ihrer Oberfläche die posttranslationale Modifikation von Proteinen stattfindet, wie das für p53 bereits gezeigt wurde, dessen Phosphorylierung an den PML-Kernkörperchen durch HIPK2 reguliert wird (Hofmann *et al.*, 2002), die Acetylierung von p53 in Folge von DNA-Schäden erfolgt durch CBP (D’Orazi *et al.*, 2002).

PML-Kernkörperchen können ihre Position innerhalb des Zellkerns in dem Chromatinbereich, in dem sie lokalisiert sind, verändern, zusätzlich können sie auch mit dem gesamten sie umgebenden Chromatinbereich bewegt werden (Görisch *et al.*, 2004). In unbehandelten Zellen erscheinen sie aber über längere Zeit relativ ortsstabil zu sein (Dellaire *et al.*, 2004; eigene Beobachtungen). Durch zellulären Stress, wie Hitzeschock, Behandlung der Zellen mit Schwermetallen und auch virale Infektionen, werden PML-Kernkörperchen zerstört und zerfallen in Mikrostrukturen. Beim Zerfall der PML-Kernkörperchen und der Reassemblierung, auch nach der Mitose, spielen posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Sumoylierung offenbar eine wichtige Rolle (Everett *et al.*, 1999; Everett, 2001).

1.3 Das Protein PML

Das Protein PML wurde in Zusammenhang mit der Krankheit **Promyelozytische Leukämie** entdeckt, von der sich auch der Name „PML“ ableitet. Bei dieser Form der Leukämie kommt es zur unkontrollierten Vermehrung von Promyelozyten, die in ihrer weiteren Differenzierung blockiert sind. In diesen Zellen zeigt das Protein PML eine abweichende Verteilung: es ist in den Zellkernen und auch im Cytoplasma dieser Zellen eher dispers in viele kleine Mikropartikel verteilt. Diese veränderte Lokalisation ist auf die Fusion des Proteins PML mit dem Retinsäurerezeptor- α (RAR- α) zurückzuführen. Zur Expression der Fusionsproteine PML-RAR und RAR-PML kommt es durch eine Translokation zwischen den Chromosomen 15, auf dem das PML-Gen liegt, und 17, welches das Retinsäurerezeptor- α -Gen trägt. Durch Retinoinsäure oder Arsenverbindungen kann das Fusionsprotein spezifisch abgebaut werden und es kommt zur Aufhebung der Differenzierungsblockade (Zhu *et al.*, 1997). Im Laufe der Remission können sich die PML-Kernkörperchen wieder neu formieren (Dyck *et al.*, 1994; Weis *et al.*, 1994).

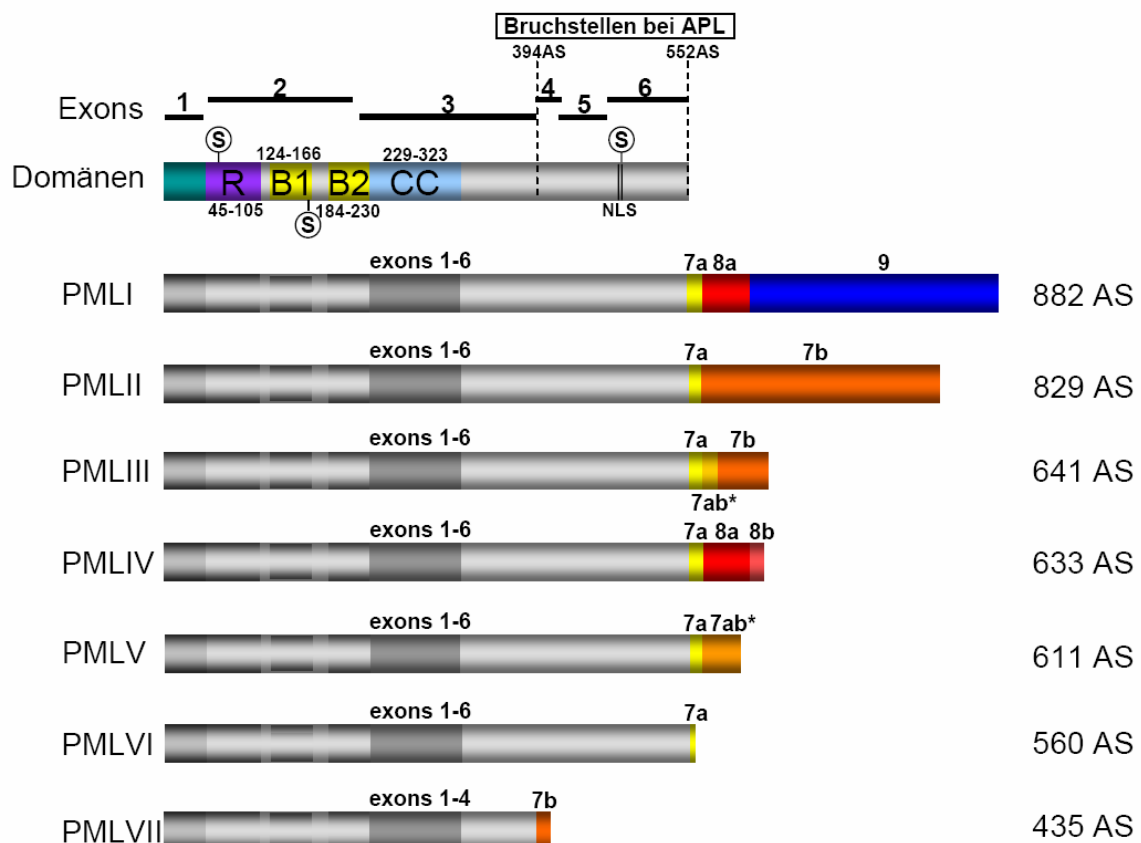


Abb. 1.4: Die Isoformen des PML-Proteins. Gezeigt ist die Zusammensetzung der Exone in den verschiedenen PML-Isoformen, sowie die Domänenstruktur des PML-Proteins. Außerdem sind die möglichen Bruchstellen, die zu Akuter Promyelozytischer Leukämie führen, eingezeichnet. (S) zeigt die Sumoylierungsstellen an, * bezeichnet nicht weggeschnittene Intronsequenzen. (modifiziert nach Jensen *et al.*, 2001)

Das PML-Gen besteht aus neun Exonen, die über 35 kb verteilt sind. Die Exone 6 bis 9 können alternativ gespleißt werden, so dass eine große Anzahl von Spleißvarianten von PML entstehen (Jensen *et al.*, 2001; Condemine *et al.*, 2006). Alle PML-Isoformen besitzen die Exone 1 bis 3, die für das RBCC/TRIM-Motiv codieren. Dieses Motiv enthält drei Cysteinereiche, Zink-bindende Domänen: den sogenannten **RING-Finger** („really interesting new gene“), zwei **B-Boxen** und außerdem eine putative „Coiled-coil“-Domäne. Das Motiv wird alternativ auch als TRIM-Motiv bezeichnet für „**TRI**partite **Motif**“ (Jensen *et al.*, 2001). Alle PML-Isoformen enthalten dieses Motiv und auch die drei Sumoylierungsstellen an Position 65, 160 sowie 490, die innerhalb des Kernlokalisierungssignals „NLS“ liegen (Abb. 1.3). Die PML-Isoformen unterscheiden sich aber in der C-terminalen Region und werden nach ihren C-terminalen Unterschieden in die Gruppen I-VII aufgeteilt (Jensen *et al.*, 2001). Die PML-Isoformen PML-I bis PML-VI enthalten ein Kernlokalisierungssignal, die PML-Isoform VII lokalisiert dagegen ausschließlich im Cytoplasma.

Die RBCC/TRIM-Proteine können über ihre „Coiled-coil“-Domäne mit sich selber interagieren, wobei die B-Boxen wohl eine Rolle bei der Orientierung der „Coiled-coil“-Domäne für die Homo-Multimerisierung und die Aufrechterhaltung der korrekten Proteinstruktur spielen (Cao *et al.*, 1997). Das RING-Finger-Motiv findet man in vielen verschiedenen Proteinen und es wurde in erster Linie als Protein-Protein-Interaktionsmodul beschrieben (Kentsis und Borden, 2000). Neben der „Coiled-coil“-Domäne ist auch die RING-Domäne für die Ausbildung der PML-Kernkörperchen *in vivo* essenziell. Mutationen in der RING-Domäne führen aber auch zum Verlust der antiviralen, apoptotischen und das Wachstum hemmenden Aktivität von PML (Jensen *et al.*, 2001).

Durch die unterschiedlichen C-Termini können die PML-Isoformen zusätzlich mit verschiedenen anderen Proteinen interagieren. So wurde z. B. bereits gezeigt, dass p53 nur mit PML-IV, nicht aber mit PML-III wechselwirkt (Fogal *et al.*, 2000). Die spezifischen Funktionen dieser unterschiedlichen PML-Isoformen sind allerdings bislang weitgehend unbekannt.

1.4 PML-Kernkörperchen und DNA-Reparatur

Die DNA des Zellkerns kann permanent von außen durch Umwelteinflüsse und auch durch Nebenprodukte des zellulären Stoffwechsels, die im Inneren der Zelle entstehen, geschädigt werden. Die UV-Strahlung im Sonnenlicht, ionisierende Strahlung, genotoxische Reagenzien,

so genannte ROS („reactive oxygen species“) wie Superoxid-Anionen, Hydroxyl-Radikale und Wasserstoffperoxid verursachen verschiedene Arten von DNA-Schäden (Su, 2006; Houtgraaf *et al.*, 2006). Nach der Induktion von DNA-Schäden wird in der Zelle die DNA-Reparatur-Maschinerie in Gang gesetzt. Handelt es sich um eine proliferierende Zelle, werden zusätzlich Zellzyklus-Kontrollpunkte aktiviert, die die Zelle bis zum Abschluß der DNA-Reparatur im Zellzyklus arretieren. So soll verhindert werden, dass Fehler in der genetischen Information an die Tochterzellen weitergegeben werden, was zur Entstehung von Krebs führen könnte.

Die unterschiedlichen DNA-Schäden wie Einzel- und Doppelstrangbrüche (DSBs), abasische Stellen, Basenmodifikationen, Dimerbildung und Vernetzungen („Crosslinks“) werden über verschiedene Reparaturwege beseitigt. Dazu gehören die direkte Reparatur („Direct damage reversal repair“), die Basen-Exzisions-Reparatur („Base excision repair“: BER), die Nukleotid-Exzisions-Reparatur („Nucleotide excision repair“: NER), die Fehlpaarungs-Reparatur („Mismatch repair“: MMR), die homologe Rekombinations-Reparatur („homologous recombination repair“: HRR) und das nicht-homologe Verbinden freier Enden („non homologous end joining“: NHEJ).

Verläuft der Reparaturprozess nicht erfolgreich, kann die Zelle in einem permanenten Zellzyklusarrest verbleiben, der zur zellulären Seneszenz, oder zur Apoptose der Zelle führt. Beide Mechanismen sollen vermeiden, dass eine Zelle mit zu vielen Mutationen in ihrer genetischen Information sich weiter teilt und diese Mutationen an die Tochterzellen weitergibt (Houtgraaf *et al.*, 2006).

Das PML-Protein und die PML-Kernkörperchen werden, wie bereits beschrieben, mit vielen zellulären Prozessen in Verbindung gebracht. Sie stellen damit multifunktionale Strukturen im Zellkern dar, an denen Proteine und Proteinkomplexe assembliert und modifiziert werden können (Zhong *et al.*, 2000; Strudwick und Borden, 2002; Dellaire *et al.*, 2003; Dellaire und Bazett-Jones, 2004). Auch der Ablauf der DNA-Reparatur muss mit den anderen zellulären Prozessen koordiniert werden. Da auch viele Proteine der verschiedenen DNA-Reparaturwege, sowie der mit der DNA-Reparatur verbundenen Prozesse, wie Zellzyklusarrest, zelluläre Seneszenz und Apoptose, transiente PML-Kernkörperchen-Komponenten sind, könnten PML-Kernkörperchen als Sensoren für DNA-Schäden fungieren und eine wichtige Rolle bei der Koordination der zellulären Prozesse in Folge der Schädigung der DNA spielen (Dellaire und Bazett-Jones, 2004). Ihr genauer Beitrag zur Regulation dieser Prozesse ist aber bislang nicht bekannt.

So konnte bereits gezeigt werden, dass die Anzahl der PML-Kernkörperchen nach DNA-Schädigung zunimmt (Carbone *et al.*, 2002; Dellaire *et al.*, 2006) und dass diese Zunahme offenbar durch das DNA-Reparaturprotein NBS1 und die Kinasen ATM, ATR und Chk2 beeinflusst wird (Dellaire *et al.*, 2006). Es wurde ebenfalls die Freisetzung des DNA-Reparaturproteins hMre11 aus den PML-Kernkörperchen, das in einem Komplex mit NBS1 und Rad50 an den Orten von DNA-Strangbrüchen lokalisiert, beschrieben (Mirzoeva und Petrini, 2001). In PML-negativen Zellen kann die p53-abhängige Expression bestimmter Gene nach der Schädigung der DNA nicht aktiviert werden, da die posttranslationale Modifikation von p53 an den PML-Kernkörperchen nicht möglich ist (Fogal *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2000).

Diese vielfältigen Beobachtungen machen deutlich, dass PML und die PML-Kernkörperchen nicht nur in einen spezifischen DNA-Reparaturweg eingebunden sind. Arbeiten zur räumlichen Assoziation von PML-Kernkörperchen mit den Orten von DNA-Schäden zeichnen bis jetzt ein uneindeutiges Bild, das vom Nichtvorhandensein bis zu vollständiger Kolo-kalisation von PML-Kernkörperchen mit DNA-Reparaturorten reicht (Bischof *et al.*, 2001; Carbone *et al.*, 2002; Seker *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; Davalos *et al.*, 2004; Boe *et al.*, 2006).

DNA-Schäden können experimentell auf verschiedene Weise und mit unterschiedlicher Stärke induziert werden. So entsteht ein experimentelles System, in dem der natürliche Prozess der DNA-Reparatur ausgelöst und die Reaktion der PML-Kernkörperchen analysiert werden kann. Dieses System kann so zum generellen Verständnis der Funktion von PML-Kernkörperchen im Zellkern höherer Eukaryoten beitragen.

1.5 Kinetische Mikroskopie

Der routinemäßige Gebrauch fluoreszierender Proteine wie GFP als Markerproteine und die Entwicklung neuer mikroskopischer Techniken erlauben es, das Verhalten von Proteinen in lebenden Zellen zu analysieren. Das Fluoreszenzprotein GFP aus der Qualle *Aequorea victoria* kann gentechnisch mit fast jedem Protein fusioniert werden, ohne dass die Eigenschaften des endogenen Zielproteins stark verändert werden (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2003). GFP-markierte Fusionsproteine können dann in lebenden Zellen exprimiert und ihre Lokalisation mikroskopisch analysiert werden. Das GFP-Protein hat ein Molekulargewicht

von 27 kD und besteht aus 11 β -Faltblättern, die eine fassartige Struktur ausbilden (Tsien, 1998). In deren Zentrum entsteht aus drei Aminosäuren durch intramolekulare autokatalytische Reaktion das Chromophor (Prasher *et al.*, 1992; Reid und Flynn, 1997).

Durch Mutagenese der GFP-codierenden Sequenz konnten zum einen die spektralen Eigenschaften, Helligkeit und Photostabilität, von GFP erhöht werden, die zur Entwicklung der GFP-Variante „EGFP“ („enhanced GFP“) führten (Cormack *et al.*, 1996). EGFP besitzt ein Absorptionsspektrum bei 488 nm und emittiert Licht mit einem einzelnen Emmisionsmaximum bei 507 nm. Zum anderen wurden auch andere Farbvarianten, die Licht im blauen (ECFP, Cerulean) oder gelben (EYFP) Wellenlängenbereich emittieren, entwickelt Heim *et al.*, 1994; Ormo *et al.*, 1996). Zusätzlich wurde aus der Seeanemone *Discosoma spec.* ein rotfluoreszierendes Protein isoliert, das ebenfalls durch Mutagenese verändert wurde und nun als monomeres rotfluoreszierendes Protein (mRFP) zur Verfügung steht (Tsien *et al.*, 2002). Eine weitere Variante ist das fotoaktivierbare GFP („photoactivatable GFP“), das nach kurzer, starker Anregung mit Licht der Wellenlänge 405 nm in einen fluoreszierenden Zustand gebracht wird (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2003). Der Einsatz der Farbvarianten der fluoreszierenden Proteine erlaubt auch Interaktionsstudien von verschiedenen Proteinen.

EGFP ist besonders gut für Lebendzelleexperimente geeignet, da es eine gute Quantenausbeute liefert, fotostabil ist und bei geringer Laserintensität während der Lebendzellbeobachtung nur geringfügig bleicht (Swaminathan *et al.*, 1997; Patterson *et al.*, 1997). Das Chromophor des EGFP kann durch hohe Laserintensitäten schnell und irreversibel zerstört werden, ohne dass zelluläre Strukturen beeinflusst oder zerstört werden, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass die fassartige Struktur des EGFP die beim Bleichvorgang entstehenden freien Radikale abfängt (Yang *et al.*, 1996; Prendergast, 1999).

Die Entwicklung mikroskopischer Techniken, die unter dem Überbegriff „Kinetische Mikroskopie“ zusammengefasst werden, erlaubt den Einsatz der unterschiedlichen, fluoreszierenden Proteine, um das Verhalten der Proteine, wie ihre Mobilität und ihre Interaktionen mit anderen Proteinen, in lebenden Zellen zu untersuchen (Phair und Misteli, 2001). Zu diesen Techniken gehören z. B. 4D-Mikroskopie, bei der über die Zeit Bildstapel von Zellen, die fluoreszierende Proteine exprimieren, aufgenommen werden. So kann die räumliche Veränderung von zellulären Strukturen über die Zeit, z. B. in Abhängigkeit vom Zellzyklus, verfolgt werden (Gerlich *et al.*, 2001). Die räumliche Nähe und damit

möglicherweise vorliegende Interaktion von Proteinen kann mit FRET („Förster resonance energy transfer“) oder FLIM („Fluorescence lifetime imaging“) untersucht werden. Bei diesen Techniken wird der Energietransfer nach der spezifischen Anregung eines Fluorophors auf ein anderes Fluorophor analysiert, der nur stattfindet, wenn die Fluorophore in der richtigen Orientierung in einem sehr geringen Abstand von 2 bis 10 nm zu einander liegen (Wouters *et al.*, 2001). Bleichexperimente adressieren in erster Linie die Mobilität der Proteine an bestimmten zellulären Strukturen. Zu den Bleichtechniken gehören FRAP („Fluorescence recovery after photobleaching“) und iFRAP („inverse FRAP“), sowie FLIP („Fluorescence loss in photobleaching“) (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2003). Mittels FCS („Fluorescence correlation spectroscopy“) und FCCS („Fluorescence cross correlation spectroscopy“) können die Mobilität und die mögliche Interaktion von Proteinen in Bereichen geringer Fluoreszenzintensität untersucht werden, wie z. B. dem Cytoplasma, dem Nukleoplasma und auch in Membranen (Bacia und Schwille, 2003).

1.5.1 FRAP: Mobilitätsmessungen von Proteinen an zellulären Strukturen

In FRAP-Experimenten kann die Dynamik von Proteinen in Bereichen höherer Fluoreszenzintensität, wie z. B. in nukleären Strukturen untersucht werden. Dazu wird innerhalb einer Zelle in einer Region oder Struktur mit hoher Fluoreszenzintensität durch einen Bleichimpuls mit starker Laserintensität die Fluoreszenz der EGFP-Fusionsproteine zerstört (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2003). Dadurch entsteht eine Population von nicht leuchtenden EGFP-Fusionsproteinen, die sofort nach dem Bleichvorgang noch von der Population der leuchtenden EGFP-Fusionsproteine getrennt ist. Verfolgt man nun den Austausch von nicht leuchtenden EGFP-Fusionsproteinen mit leuchtenden EGFP-Fusionsproteinen im gebleichten Bereich über die Zeit bis sich ein Gleichgewicht eingestellt hat, erhält man Informationen über das dynamische Verhalten dieses Proteins. Schon während des Experiments entsteht ein qualitativer Eindruck von der Mobilität des Proteins. Eine quantitative Auswertung der Bildinformationen kann zusätzlich Informationen über immobile Fraktionen und den Diffusionskoeffizienten des Proteins liefern (Carrero *et al.*, 2003).

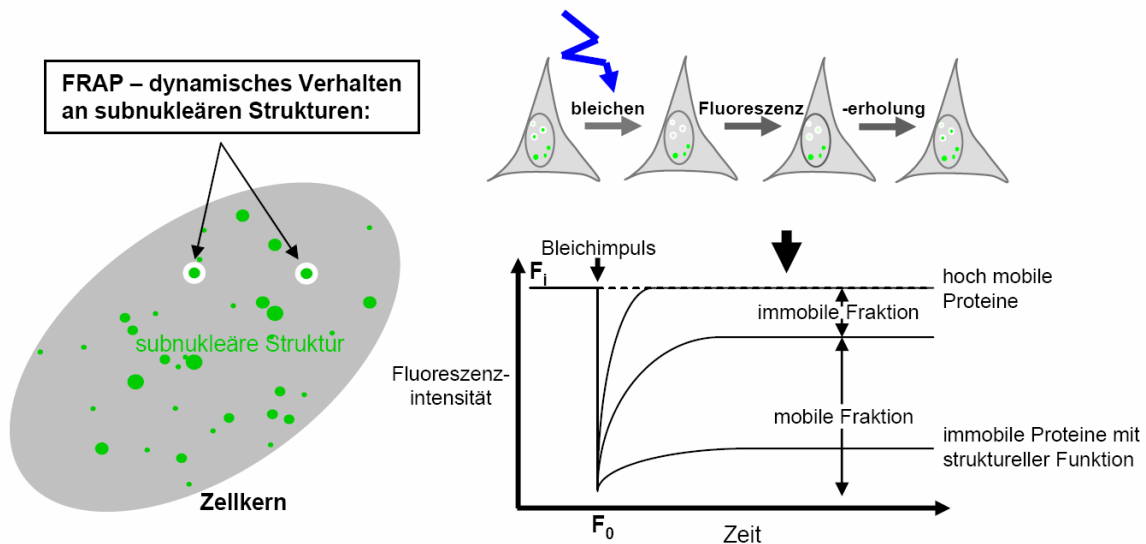


Abb. 1.5: FRAP-Messungen an subnukleären Strukturen im Zellkern. FRAP-Messungen ermöglichen Aussagen zum dynamischen Verhalten von Proteinen an zellulären Strukturen. In quantitativen Analysen von FRAP-Experimenten können auch immobile Fraktionen von Proteinen bestimmt werden.

FRAP-Analysen haben dazu beigetragen, die Funktion nukleärer Komplexe besser zu verstehen. So konnte in FRAP-Experimenten gezeigt werden, dass die Histone in den Nukleosomen unterschiedliche Verweilzeiten haben (Misteli *et al.*, 2000; Kimura und Cook, 2001). Während das Linker-Histon H1 im Bereich von Minuten an den Nukleosomen ausgetauscht wird, liegt die Verweildauer der Histone im Nukleosom im Stundenbereich. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Mobilität der Histone sich im Verlauf der S-Phase, wenn die DNA repliziert wird, und in transkriptionell aktiven Bereichen erhöht ist (Kimura und Cook, 2001).

Proteine, die an aktiven Komplexen, wie z. B. den Replikationsfabriken, lokalisiert sind, zeigen meist schnellere Austauschraten. Das Protein PCNA („Proliferating cell nuclear antigen“), das als Trimer in Form eines Ringes an der Replikationsgabel die DNA-Polymerase stabilisiert, zeigt eine signifikante Fluoreszenzerholung innerhalb von 15 Minuten, das Protein RPA („Relication protein-A“) wird hingegen innerhalb von 1 bis 2 Sekunden vollständig ausgetauscht. Die Erkenntnisse über die Mobilität von PCNA haben zu der Annahme geführt, dass zur Replikation der Okazaki-Fragmente des „Lagging strand“ bei der DNA-Replikation nicht jeweils ein neuer PCNA-Ring assembliert wird, sondern PCNA länger mit der Replikationsmaschinerie assoziiert ist (Sporbert *et al.*, 2002). Die Komponenten des RNA-Polymerase I-Komplexes werden ebenfalls sehr schnell zwischen dem Nukleoplasma und den ribosomalen Transkriptionsstellen ausgetauscht (Dundr *et al.*, 2002). Bei den an der DNA-

Reparatur beteiligten Proteinen Chk2 und NBS1 wurde unterschiedliches, dynamisches Verhalten beobachtet: Chk2 ist auch nach der Schädigung der DNA sehr mobil und kann so als Signalverteiler im Zellkern dienen, NBS1 hat an den Orten von DNA-Schäden eine geringere Austauschrate als im übrigen Zellkern und kann seine Funktion am Ort der DNA-Schädigung ausüben (Lukas *et al.*, 2003). In einer kinetischen Analyse verschiedener Cajal-Kernkörperchenkomponenten konnten diese nach ihren unterschiedlichen Dissoziationskinetiken an den Cajal-Kernkörperchen, die auf unterschiedliche Rückhaltemechanismen an den Cajal-Kernkörperchen zurück geführt werden, in drei Gruppen subklassifiziert werden (Dundr *et al.*, 2004).

So haben FRAP-Studien gezeigt, dass viele Multiproteinkomplexe keine statischen Einheiten in der Zelle sind, sondern ein stetiger Austausch von Proteinen für die Funktion dieser Komplexe notwendig ist (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2001).

1.5.2 FCS: Dynamisches Verhalten von Proteinen im Nukleoplasma

Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) ist eine Einzelmolekültechnik, die zur Analyse von sehr gering konzentrierten Molekülen in Lösung mit hoher zeitlicher und räumlicher Auflösung genutzt werden kann. Sie basiert auf der Analyse von spontanen Fluoreszenzfluktuationen fluoreszierender Moleküle. Dazu werden die Fluoreszenzfluktuationen in einem räumlich begrenzten Messvolumen detektiert (Abb. 1.6). Aus den Fluoreszenzfluktuationen können Informationen über die Konzentration, die Dynamik, Dissoziations- und Assoziationsprozesse gewonnen werden (Dittrich *et al.*, 2001, Haustein und Schwille, 2003), in Abhängigkeit von den spektralen und molekularen Eigenschaften des Moleküls (Elson, 2001).

Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie ist für die Anwendung in Zellen gut geeignet, da die Messungen bei geringen Laserintensitäten durchgeführt werden und durch die geringe Größe des konfokalen Volumens eine hohe Ortsauflösung besitzen (Schwille, 2001; Medina und Schwille, 2002). In lebenden Zellen beeinflussen allerdings zelluläre Autofluoreszenz, Photobleichen des GFP-Moleküls und die Eigenbewegung der Zellen die Messungen und müssen bei der Auswertung berücksichtigt werden (Haustein und Schwille, 2003).

Das konfokale Messvolumen beträgt einen Femtoliter (10^{-15} l). Bei seiner Diffusion durch das konfokale Volumen emittiert ein Fluorophor Photonen, die als Intensitätsfluktuationen

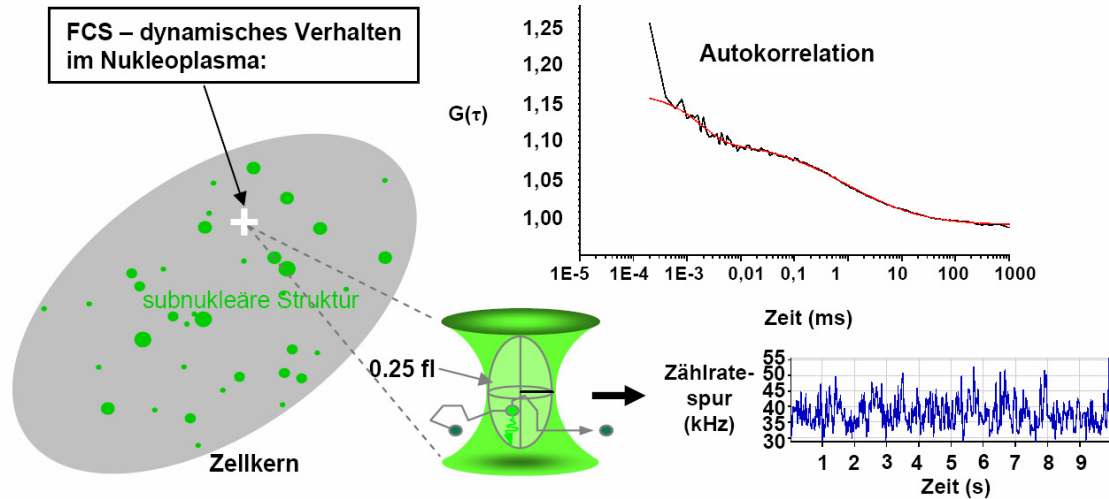


Abb. 1.6: FCS-Messungen im Nukleoplasma: Durch die Messung der Fluoreszenzfluktuationen in einem konfokalen Volumen und die anschließende Autokorrelation des Signals kann die Mobilität und die Konzentration eines Proteins bestimmt werden.

detektiert werden können. Die Anzahl der emittierten Photonen je Zeiteinheit ist abhängig von der Konzentration der Moleküle und ihrer Diffusionszeit, sowie von der Quantenausbeute und den Tripletstadien des Moleküls.

In Abb. 1.6 sind in der Zählratespur typische Fluoreszenzfluktuationen dargestellt. Aus den Fluktuationsveränderungen in Abhängigkeit von der Zeit wird eine Autokorrelationskurve berechnet (Abb. 1.6, rechts oben). Um genaue Resultate zu erhalten, müssen durch die Autokorrelationsfunktion sehr viele Fluktuationen analysiert werden. Die Autokorrelationsfunktion berechnet die durchschnittliche Verweildauer τ des Moleküls im konfokalen Volumen. Dazu wird die Fluoreszenz als Funktion der Zeit aufgenommen $F(t)$, die um einen Mittelwert $\langle F(t) \rangle$ fluktuiert (Elson und Magde, 1974; Magde *et al.*, 1974; Rigler *et al.*, 1993)

$$\delta F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle \quad (1)$$

Die normalisierte Autokorrelation wird beschrieben als

$$G(\tau) = \frac{\langle \delta F(t) \cdot \delta F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2} \quad (2),$$

wobei $\langle \rangle$ den gemittelten Wert darstellt.

Mit FCS kann das dynamische Verhalten von Proteinen im Bereich von einer Mikrosekunde bis zu 100 Millisekunden analysiert werden (Haustein und Schwille, 2003). Schnellere Dynamiken werden normalerweise nicht einbezogen, da hier die Einflüsse der Messinstrumente überwiegen („after pulsing“ des Detektors, siehe Bacia und Schwille, 2003). Die eigentliche Limitierung der FCS liegt im Bereich langsamerer Mobilität von Proteinen. Durch verlängerte Messzeiten langsamer Moleküle kann es zu Bleicheffekten kommen, die vortäuschen, dass ein Molekül bereits aus dem konfokalen Volumen ausgetreten ist. Das hat eine künstlich erhöhte Diffusionsgeschwindigkeit bei der Auswertung zur Folge und erschwert eine korrekte Kurvenanpassung. Langsamere Mobilitäten von Proteinen im Sekundenbereich können alternativ mit FRAP-Experimenten untersucht werden.

Auch das EGFP-Protein hat durch seine biochemischen Eigenschaften Einfluß auf die Fluoreszenzfluktuationen und damit die Autokorrelationskurve. Der Tyr66-Rest von EGFP kann abhängig vom pH-Wert reversibel protoniert werden. Dies führt zu intramolekularen Fluktuationen in einem Zeitbereich von 10 bis 100 μ s, wobei der protonierte Zustand fluoresziert. Der deprotonierte Zustand hingegen kann nicht mit der Wellenlänge 488 nm angeregt werden. Dieses Phänomen wird als Blinken bezeichnet. Auch der Triplettzustand von Molekülen geht im Bereich von 1 bis 5 μ s in die Autokorrelationskurve mit ein. Dieser Zustand wird erreicht, in dem ein angeregtes Molekül aus dem Singulettstadium S_1 nicht in den Grundzustand S_0 zurückfällt, sondern im Triplettstadium T_1 verharrt und ohne Emittieren eines Photons in den Grundzustand zurückfällt. Dieser Prozess wird in dem in dieser Arbeit angewendeten Diffusionsmodell durch eine Exponentialfunktion berücksichtigt (Gl.8).

In FCS-Messungen im Zellkern lebender Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass das Heterochromatinprotein 1, HP1, sehr mobil ist und z. T. in makromolekularen Komplexen im Nukleoplasma diffundiert (Schmiedeberg *et al.*, 2004). Auch die nukleäre poly(A)RNA ist im gesamten Nukleoplasma, auch in den Speckles, hochmobil, wie in FCS-Messungen festgestellt wurde (Poltz *et al.*, 2006). Mit Hilfe der mit FCS assoziierten Technik „Continuous Photobleaching“, (CP), konnte eine mobile Population fluoreszenzmarkierter H2B-Histone im Nukleoplasma identifiziert werden (Weidemann *et al.*, 2003).

Werden FRAP- und FCS-Technikparallel genutzt, kann man das gesamte Spektrum der Dynamik von nukleären Proteinen analysieren (Schmiedeberg *et al.*, 2004; Schmiedeberg *et al.*, 2005).

1.6 Ziel der Arbeit

Der Zellkern einer eukaryotischen Zelle ist durch viele verschiedene nukleäre Domänen strukturiert. Diese Domänen stellen membranlose makromolekulare Proteinkomplexe mit einer jeweils charakteristischen Proteinzusammensetzung dar. Sie beteiligen sich an nukleären Prozessen, wie z. B. Transkription, Replikation, Spleißen, DNA-Reparatur, Chromosomen-Segregation und der Steuerung des Zellzyklus. Der dynamische und schnelle Austausch von Proteinen der verschiedenen Multiproteinkomplexe untereinander und mit freien Proteinen im Nukleoplasma ist Grundlage für deren Funktion und Regulation (Shav-Tal *et al.*, 2006). Die Analyse der Mobilität einzelner Proteinkomponenten dieser Multiproteinkomplexe und auch die Untersuchung der Dynamik gesamter nukleärer Strukturen trägt dazu bei, den Aufbau und die Funktionsweise dieser Komplexe zu verstehen und damit einen Einblick in die dynamische Regulation der im Zellkern ablaufenden Prozesse zu bekommen. In diesem Zusammenhang sollte im Rahmen dieser Arbeit das dynamische Verhalten von Proteinkomponenten zweier nukleärer Strukturen, der Centromer-/Kinetochorkomplexe und der PML-Kernkörperchen, in der lebenden Zelle untersucht werden.

Die inneren Kinetochorproteine CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-H, CENP-I und hMis12 lokalisieren während des gesamten Zellzyklus am Centromer-/Kinetochorbereich der Chromosomen. Um den Mechanismus zur Assemblierung und die Funktionsweise des Centromer-/Kinetochorbereiches während des gesamten Zellzyklus besser zu verstehen, sollte in FRAP-Versuchen die Mobilität von EGFP-markierten inneren Kinetochorproteine am Centromer-/Kinetochorkomplex in Abhängigkeit vom Zellzyklusstadium analysiert werden. Zusätzlich wurde das dynamische Verhalten dieser Proteine im Nukleoplasma mit FCS untersucht.

Die strukturelle Komponente der multifunktionalen PML-Kernkörperchen ist das Protein PML. Erst in jüngster Zeit fand größere Beachtung, dass es sechs verschiedene PML-Isoformen gibt, die sich im C-terminalen Bereich unterscheiden (Beech *et al.*, 2005; Condemine *et al.*, 2006). Diese PML-Isoformen haben spezifische Interaktionspartner und können somit auch unterschiedliche Funktionen im Zellkern und speziell an den PML-Kernkörperchen haben (Fogal *et al.*, 2000). Die Bedeutung der sechs unterschiedlichen PML-Isoformen bei der Bildung und Aufrechterhaltung der PML-Kernkörperchen ist bislang nicht bekannt. In FRAP-Versuchen sollte die Mobilität von sechs EGFP-markierten nukleären

PML-Isoformen an PML-Kernkörperchen untersucht werden, um neue Erkenntnisse über den Beitrag der einzelnen PML-Isoformen zur Formation dieser nukleären Struktur zu erhalten. Auch hier sollten FCS-Messungen durchgeführt werden, um die Dynamik der Fusionsproteine außerhalb der Kernkörperchen zu untersuchen.

Da auch DNA-Reparaturproteine zu den transienten Proteinkomponenten der PML-Kernkörperchen gehören, wird vermutet, dass sie auch eine Rolle bei der DNA-Reparatur spielen. Zu der Frage, ob ihre Funktion bei der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur mit einer räumlichen Nähe zu Orten der DNA-Reparatur einhergeht, gibt es widersprüchliche Aussagen (Bischof *et al.*, 2001; Carbone *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003; Seker *et al.*, 2003, Dellaire *et al.*, 2006). Deshalb sollte die Lokalisation von PML-Kernkörperchen, DNA-Reparaturstellen und dem DNA-Reparaturprotein NBS1 im Zellkern zu verschiedenen Zeitpunkten nach DNA-Schädigung analysiert werden. Dabei sollte auch die Überlebensrate in Abhängigkeit vom Grad der DNA-Schädigung überprüft werden.

2 Material

2.1 Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien waren vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad. Sie stammten von den Firmen Fluka (Bruchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Taufkirchen). Das verwendete Wasser wurde mit einer Reinstwasseranlage (Milli-Q Plus 185, Millipore, Eschborn) gereinigt. Lösungen wurden, falls notwendig, 20 Minuten bei 121°C autoklaviert oder sterilfiltriert.

2.2 Software zur Bildaufnahme, Bildverarbeitung und Datenkalkulation

Zeiss LSM510Meta, Version 3.2

Adobe® Photoshop® CS

Mircocal Origin®, Version 7.0

Microsoft Excel 2003

2.3 Verwendete Zelllinien

HEp-2	humane Epithelzellen, CCL-23, American Tissue Culture Collection (ATCC), USA
U2OS	humane Osteosarcomzellen, HTB-96, American Tissue Culture Collection (ATCC), USA
WI39	untransformierte, humane Lungenfibroblasten, CCL-75, American Tissue Culture Collection (ATCC), USA
Hela-YFP-CENP-H	humane Epithelzelllinie aus Cervixkarzinom, die das Fusionsprotein EYFP-CENP-H stabil exprimiert; die Zelllinie wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von I. M. Cheesman, Ludwig Institute for Cancer Research, L Jolla, USA

2.4 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

2.4.1 Primäre Antikörper

Anti-CENP-A	Maus, IgG, monoklonal, MBL, Woburn, USA; Arbeitskonzentration: 1:100
Anti-CENP-C	Meerschweinchen, polyklonal, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von K. Yoda, Nagoya University, Japan; Arbeitskonzentration: 1:100
Anti-PML	<u>Chemicon</u> : Kaninchen, polyklonal, Temecula, USA; Arbeitskonzentration: 1:100 <u>PG-M3</u> : Maus, IgG, monoklonal, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA; Arbeitskonzentration: 1:100 <u>Anti-Peptid (Aminosäuren 460-479)</u> : Kaninchen, polyklonal; Arbeitskonzentration: 1:50 (im Western Blot)
Anti-γH2AX	Maus, IgG, monoklonal, Upstate, Lake Placid, USA Arbeitskonzentration: 1:400
Anti-p(S343)NBS1	Kaninchen, polyklonal, Abcam, Cambridge, UK; Arbeitskonzentration: 1:500
Anti-GFP	Maus, IgG, monoklonal, Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, USA; Arbeitskonzentration: 1:50

2.4.2 Sekundäre Antikörper, DNA-Farbstoff und Mounting

Sekundäre Antikörper

FITC-anti-Maus-IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA; 1:200
Rhodamin-anti-Maus-IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA; 1:200
Cy3-anti-Maus-IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA; 1:400
FITC-anti-Kaninchen	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA; 1:200

Rhodamin-anti-Kaninchen	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA; 1:200
Cy3-anti-Kaninchen	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA; 1:400
Rhodamin-anti-Meerschweinchen	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA; 1:200

DNA-Farbstoff

To-Pro3-Iodid	Molecular Probes, Eugene, USA; Stammlösung 1:500 verdünnt
---------------	--

Mounting-Medium

ProLong Gold Antifade Mounting-Medium	Molecular Probes, Eugene, USA
---------------------------------------	-------------------------------

2.5 Plasmide

Die Klonierungen der Expressionsvektoren, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, wurden von Dr. Christian Hoischen geplant und überprüft. Durchgeführt wurden die Klonierungen von M. Koch, S. Pfeiffer und S. Ohndorf, sowie I. Erliandri und Dr. A. Rapp.

Alle Plasmide wurden durch Sequenzierung (MWG Biotech, Ebersberg, München) auf ihre Richtigkeit überprüft.

Centromere

- **pEGFP-CENP-A:** entspricht dem Vektor pGFP-AF8-CENP-A, der freundlicherweise von K. Sugimoto, Japan, zur Verfügung gestellt wurde.
- **pEGFP-CENP-B:** die CENP-B-cDNA wurde über PCR vom Ausgangsvektor pT7.7/CENP-B, der freundlicherweise von W. Earnshaw, University of Edinburgh, UK, zur Verfügung gestellt wurde, amplifiziert (Expand high fidelity ^{PLUS}PCR System, Roche, Penzberg) und das PCR-Fragment in die EcoRI/SalI-Schnittstelle des pEGFP-C2-Vektors (BD Biosciences, Clontech, Palo Alto, USA) einkloniert.
Primer: forward: 5'-GAA TTC ATG GGC CCC AAG AGG CGA CA-3', reverse: 5'-GTC GAC ATT ACA CCG GTT GAT GTC CAA GAC CTC GAA CTC-3'
- **pEGFP-CENP-B-DBD:** entspricht dem Plasmid pCBS65T, der für die an EGFP-fusionierte DNA-bindende Domäne von CENP-B kodiert (Shelby *et al.*, 1996) und

wurde freundlicherweise von K. F. Sullivan, The Scripps Research Institute, La Jolla, USA zur Verfügung gestellt.

- **pEGFP-CENP-C, pEGFP-CENP-C315-635, pEGFP-CENP-C635-943:** die codierende Sequenz für das Voll-Längen-Protein CENP-C, sowie die Subfragmente CENP-C315-635 und CENP-C635-943 wurden über PCR vom rekombinanten Plasmid pTCATG amplifiziert, das ebenfalls freundlicherweise von W. Earnshaw zur Verfügung gestellt wurde, und in die XhoI/PspOMI-Schnittstelle des pEGFP-C2-Vektors einkloniert

Primer: CENP-C forward: 5'-TTC ATC TCG AGT ATG GCT GCG TCC GGT CTG GAT CA-3', CENP-C/ CENP-C635-943 reverse: 5'-ACT TAC TGC AGC GGC CGC TAT CAT CTT TTT ATC TGA GTA AAA-3', CENP-C315-635 forward: 5'-TTC ATC TCG AGT TCT TGG ATT ACA ATA CCA AGA AA-3', reverse: 5'-ACT TAC TGC AGC GGC CGC TAT CTA GAA CAA TCA AGA TTT TTC-3', CENP-C635-943 forward: 5'-TTC ATC TCG AGT TCT ACA AGA AGC TCA AAG AAT GAA-3'

- **pEGFP-CENP-I:** die CENP-I-cDNA wurde freundlicherweise von T. Yen und S. Tao (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA) zur Verfügung gestellt und über PCR amplifiziert, das PCR-Fragment wurde in die Xho/PspOMI-Schnittstelle des pEGFP-C2-Vektors kloniert

Primer: forward: 5'-CAT GTC GAC GAT GTC ACC TCA AAA GAG AGT TAA GAA-3', reverse: 5'-TGC AGC GGC CGC TTT TAA TAT TGA TTG TTG CAG TTT-3'

- **pEGFP-hMis12:** die hMis12-cDNA wurde vom Plasmid IRAUp969C0611D6-pOTB7 (RZPD, Berlin) über PCR amplifiziert und in die EcoRI/PspOMI-Schnittstelle des pEGFP-C3-Vektors einkloniert

Primer: forward: 5'-GAA TTC TGT CGA CCA TGT CTG TGG ATC CAA TGA C - 3', reverse: 5'-GCG GCC GCT TAA GAT ATT TTC AGT CGT TTC G-3'

PML-Kernkörperchen

Vektoren, die die cDNA für die PML-Isoformen für PMLI, PMLII und PMLV enthalten, wurden freundlicherweise von K.-S. Chang, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA, zur Verfügung gestellt, (Xu *et al.*, 2004).

Vektoren, die die cDNA für die PML-Isoformen für PMLIII, PMLIV und PMLVI enthalten, wurden freundlicherweise von T. Hofmann, DKFZ, Heidelberg zur Verfügung gestellt.

Alle PML-tragenden Vektoren wurden durch Sequenzierung der Genregion und ihrer flankierenden Regionen überprüft.

- **pEGFP-PML-I:** aus dem Vektor pCDNA3.1-PMLI wurde die cDNA für PMLI als BamHI/XbaI-Fragment in den Vektor pEGFP-C1 inkloniert
- **pEGFP-PML-II:** aus dem Vektor pCDNA3.1-PMLII wurde die cDNA für PMLII als HindIII/EcoRI-Fragment in den Vektor pEGFP-C3 inkloniert
- **pEGFP-PML-III:** aus dem Vektor pSG5PMLkomplett wurde die cDNA für PMLIII als BglII/PspOMI-Fragment in den Vektor pEGFP-C1 inkloniert
- **pEGFP-PML-IV:** aus dem Vektor pCDNA3.1-PMLIV wurde die cDNA für PMLIV als BglII/PspOMI-Fragment in den Vektor pEGFP-C1 inkloniert
- **pEGFP-PML-V:** aus dem Vektor pCDNA3.1-PMLV wurde die cDNA für PMLV als BglII/EcoRI-Fragment in den Vektor pEGFP-C1 inkloniert
- **pEGFP-PML-VI:** nach dem Verdau des Ursprungsvektors mit NcoI befand sich das PML VI codierende Gen auf einem 1734 bp Fragment, in einer Kleenow-Reaktion wurden die Basenüberhänge am 5'- und am 3'-Ende aufgefüllt, es wurde dann in den mit SmaI aufgeschnittenen Vektor pEGFP-C1 inkloniert, mittels eines XhoI-DraIII-Verdau wurde die richtige Orientierung überprüft

3 Methoden

3.1 Zellkultur und Transfektion von Zellen

3.1.1 Zellkultur eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung aller in der Arbeit verwendeten Zelllinien erfolgte in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; PAA, Pasching, Österreich) mit 10 % FCS (PAA, Pasching, Österreich) bei 37 °C und 10 % (v/v) CO₂-Atmosphäre in Gewebekulturflaschen mit einer Grundfläche von 75 cm². Nach 48 bis 60 Stunden, oder bevor sich ein konfluenter Monolayer gebildet hatte, wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde die Zellschicht vorsichtig mit 1xPBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS wurden 4 ml 1xTrypsin/EDTA-Lösung (PAA, Pasching, Österreich) zugegeben. Nach einigen Minuten Inkubation im Brutschrank konnte die Zellschicht durch die Zugabe von 4 ml DMEM mit Zusätzen und mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette vom Boden der Kulturflasche abgelöst werden. Die Zellsuspension wurde anschließend für 2 min bei 900 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 8 ml DMEM mit Zusätzen resuspendiert. In Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp wurden 1 ml bis 4 ml dieser Zellsuspension in 20 ml frisches Medium überführt. Zellen, die stabil ein EGFP-Fusionsprotein exprimieren, zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks das Antibiotikum G418 in der Endkonzentration 50 µg/ml zugegeben.

3.1.2 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Zur Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen wurde das Transfektionsreagenz FuGENE6 (Roche, Penzberg) eingesetzt, dessen Funktionsweise auf der Liposomen-vermittelten Transfektion von DNA in Zellen basiert. Das Transfektionsreagenz zeichnet sich dadurch aus, dass es nur eine geringe Zytotoxizität aufweist und trotzdem eine gute Transfektionseffizienz bei den hier eingesetzten Zelllinien erreicht wurde. Für die Transfektion wurden Zellen bis zu einer Konfluenz von etwa 70 % kultiviert. In 50-200 µl FCS-freiem Medium, abhängig von der Oberfläche des Kulturgefäßes der zu transfizierenden Zellen, wurde ein Transfektionsansatz vorbereitet, indem zunächst das Transfektionsreagenz FuGENE6 dem serumfreien Medium zugegeben wurde. Nach 5 min Inkubationszeit wurde auch die DNA zugegeben. Der Ansatz wurde gut durchmischt und für weitere 15 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Danach konnte der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen transfiziert werden. Ein Mediumwechsel war nicht erforderlich.

3.2 Induktion von DNA-Schäden

3.2.1 UV-A-Mikrostrahl

Mit einem Lasermikrostrahl können einzelne Zellen und Zellkompartimente wie der Zellkern gezielt geschädigt werden. Dazu wird ein N₂-Laser der Wellenlänge 337 nm eingesetzt, der über den Fluoreszenzstrahlengang in ein Inversmikroskop eingekoppelt wird. Die Bestrahlungsenergie des gepulsten Lasers beträgt in der Fokusebene etwa 20 µJ pro Puls mit einer Pulslänge im Nanosekundenbereich (Dissertation A. Rapp, 2004, Universität Jena).

Für die Behandlung mit dem UV-A-Mikrostrahl wurden Zellen auf Deckgläschen mit eingetätztem Gitternetz (Cellocate®, Eppendorf) angezogen, um die bestrahlten Zellen nach der Behandlung und der nachfolgenden Immunfluoreszenzfärbung wieder lokalisieren zu können. Zur Manipulation mit dem UV-A-Mikrostrahl wurden die Deckgläschen mit der mit Zellen bewachsenen Seite nach unten zeigend in Nunc®-Kammern mit vorgewärmtem Kulturmedium überführt. Im Phasenkontrast-Modus wurden einzelne Zellen ausgewählt und ihre Position auf dem Deckgläschen festgestellt. Die Zellkerne dieser Zellen wurden entlang einer gedachten Linie einmal oder mehrfach mit dem UV-A-Mikrostrahl bestrahlt. Nach der Behandlung wurden die Zellen wieder in Kulturschälchen überführt und weiter kultiviert bis zur Fixierung für die nachfolgende Immunfluoreszenzfärbung.

3.2.2 γ-Bestrahlung

Die Bestrahlung mit ionisierender Strahlung wurde mit einer ¹³⁷Cs-Quelle durchgeführt („Gammacell GC40“). Die Strahlenquelle hat eine zentrale Dosisrate von 1,23 Gy/min und ist ein gemischter γ- und β-Strahler. Unter Berücksichtigung der aktuellen Zerfallskonstante (zum Zeitpunkt der Messungen betrug diese etwa 0,98) konnte die Bestrahlungszeit für die jeweilige Bestrahlungsdosis berechnet werden:

$$\frac{\text{gewünschte Dosis (Gy)}}{\text{zentrale Dosisrate (Gy/min)} \times \text{Zerfallskonstante}} = x, yz \text{ min Bestrahlungsdauer} \quad (3)$$

$$\text{Umrechnung Zehntel in Sekunden: } \frac{yz \times 60}{100} = \text{sec Bestrahlungszeit} \quad (4)$$

Die Zellen wurden einen Tag vor der Bestrahlung auf Deckgläschen mit einem Durchmesser von 15 mm in 6-Napf-Platten eingesät, so dass sie am nächsten Tag zu 50-60 % konfluent waren. Zur gleichmäßigen Bestrahlung wurden die 6-Napf-Platten in der Mitte der Bestrahlungskammer platziert. Die Bestrahlung erfolgte bei Raumtemperatur. Nach dem Ende der Bestrahlungszeit wurden die 6-Napf-Platten entnommen. Die Zellen wurden im Brutschrank weiterkultiviert, zu den entsprechenden Zeitpunkten nach der Bestrahlung entnommen und für die Immunfluoreszenzfärbung fixiert.

3.3 Colony Forming Assay

Um die Überlebensrate von humanen Zellen nach ionisierender Bestrahlung zu überprüfen, wurde ein „Colony Forming Assay“ durchgeführt. Dazu wurden jeweils 1000 Zellen in Kulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm eingesät. Nachdem die Zellen über Nacht angewachsen waren, wurden die Zellen am nächsten Tag unterschiedlichen Dosen ionisierender Bestrahlung ausgesetzt. Danach wurden die Zellen weiter kultiviert bis die unbehandelten Zellen nach 10 Tagen im Mikroskop deutlich erkennbare Kolonien von etwa 30 Zellen gebildet hatten. In dieser Zeit wurde das Medium alle drei Tage gewechselt.

Zur Auswertung wurden die Zellen mit 1xPBS gewaschen und mit 10 ml -20 °C kalten Methanols für 15 min fixiert. Nach erneutem, zweimaligem Waschen mit 1xPBS wurden die Zellen mit 5 ml Giemsa-Färbelösung für 15 min gefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Dann wurden die Petrischalen an der Luft getrocknet. Die blau angefärbten Zellkolonien in den Petrischalen konnten nun ausgezählt werden.

3.4 Western Blot

3.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und abtrypsinisiert. Die Zellsuspension wurde 2 min bei 900 g und 4 °C abzentrifugiert. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Das Zellpellet wurde zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 50 µl PBS gelöst und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dann wurde die gleiche Menge 4x Probenpuffer zugegeben und die Probe wurde im Heizblock für 10 min auf 100 °C erhitzt. Bis zur Weiterverwendung wurden die Lysate bei –80 °C gelagert.

4 x Probenpuffer	60 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	2 %	SDS
	25 %	Glycerin
	0,1 %	Bromphenolblau
	35 mM	Dithiothreitol

3.4.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Mit Hilfe der diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) werden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt.

Zunächst wurde ein 10, bzw. 12,5 %iges Trenngel (w/v Polyacrylamid) gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Trenngels wurde das Wasser vollständig entfernt, die 4 %ige Sammelgellösung wurde auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm wurde eingesetzt. War das Sammelgel auspolymerisiert, wurde der Probenkamm vorsichtig entfernt. Das Gel wurde in eine vertikale Gelapparatur eingesetzt. Die Geltaschen wurden mit Laufpuffer gespült und die Gelapparatur mit Laufpuffer gefüllt. Die Geltaschen wurden mit den mit Probenpuffer versetzten Proben beladen. Zusätzlich wurde ein Protein-Standard („Broadrange“, Biorad, Krefeld), der Proteine bekannter Größe enthält, aufgetragen. Die Proben liefen bei einer Stromstärke von 30 mA in das Sammelgel ein, dann wurde die Stromstärke auf 40 mA erhöht. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 30 min im Coomassie-Brilliant-Blue-Färbepuffer geschwenkt, danach einige Stunden entfärbt.

Laufpuffer	30,2 g	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
	144,0 g	Glycin
	0,1 % (w/v)	SDS
		ad 1000 ml ddH ₂ O
Trenngel (10 % (w/v) Polyacrylamid)	6,65 ml	30 % Acrylamid-Stammlösung
	0,3 ml	2 % Bisacrylamid-Stammlösung
	7,5 ml	1 M Tris, pH 8,7
	0,1 ml	20 % SDS
	1,57 ml	ddH ₂ O
	16 µl	TEMED
	66,7 µl	10 % APS-Lsg.
Sammelgel (4 % (w/v) Polyacrylamid)	1,7 ml	30 % Acrylamid-Stammlösung
	0,7 ml	2 % Bisacrylamid-Stammlösung
	1,25 ml	1M Tris, pH 6,9
	50 µl	20 % SDS
	6,35 µl	ddH ₂ O
	25 µl	TEMED
	50 µl	10 % APS-Lsg.
Färbelösung	50 % (v/v)	Methanol
	0,1 % (w/v)	Coomassie Brilliant Blue R-250
	10 % (v/v)	Essigsäure
Entfärbelösung	30 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure

3.4.3 Immunblot

Die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden im Immunblot-Verfahren (Western-Blot) mittels einer Blot-Apparatur und Transfer-Puffers auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Der Transfer erfolgt 45 min bei 70 mA (1 mA pro cm² Gel). Die Effizienz der Übertragung kann überprüft werden, indem das Gel nach dem Blot nochmal gefärbt wird. Je effizienter die Übertragung war, desto schwächer erscheinen die Banden im Gel. Die Nitrocellulose-Membran kann mit Pouceau-Rot eingefärbt und mit ddH₂O bis zum gewünschten Grad wieder entfärbt werden.

Transferpuffer	26,5 mM	Tris
	0,2 M	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol

Die Bahnen auf der Nitrocellulose-Membran wurden je nach Anzahl der eingesetzten Antikörper in 3 mm breite Streifen geschnitten und beschriftet. Zur Vermeidung von unspezifischen Antikörperbindungen wurden die Streifen unter beständigem Schwenken 60 min in PBS-T mit 4 % Milchpulver geblockt. Für die Herstellung der Antikörperverdünnungen wurde ebenfalls die Blockierlösung verwendet. Die Streifen wurden dann auf Parafilm ausgelegt. Es folgte die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper für 1 h. Die Streifen wurden dann dreimal mit PBS-T gespült und anschließend auf einem Schüttler in PBS-T gewaschen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt, bevor die Streifen wieder auf Parafilm ausgelegt und für 45 min mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert wurden. Die Signale wurden mit einem Chemilumineszenz-Reagenz (ECL, Amersham) auf Röntgenfilm (Biomax, Kodak, USA) detektiert.

3.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurden die auf Deckgläschen angezogenen Zellen zunächst mit 1xPBS gewaschen und für 10 min mit einer 4 %igen Formaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Nach erneutem Waschen mit 1xPBS erfolgte ein Permeabilisierungsschritt mit 0,25 % Triton-X100 für 3 min bei Raumtemperatur.

Die Antikörper wurden in 1xPBS entsprechend verdünnt. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper erfolgte für 45 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer, indem 25 µl der Antikörperlösung in der feuchten Kammer auf Parafilm pipettiert wurden und dann das Deckgläschen mit der mit Zellen bewachsenen Seite auf die Antikörperlösung gelegt wurde. So konnte ein Austrocknen der Zellen auf dem Deckgläschen während der Inkubationszeit verhindert werden, gleichzeitig musste nur eine sehr kleine Menge der Antikörperlösung hergestellt werden. Nach der Inkubation mit dem 1. Antikörper wurden die Zellen mit 1xPBS aufgeschwemmt und wieder invertiert. Dann wurden die Deckgläschen dreimal für 5 min mit 1xPBS gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte auf die gleiche Weise. Auch nach diesem Schritt wurden die Zellen für dreimal 5 min mit 1xPBS gewaschen. Zur Färbung der DNA wurden die Zellen für 10 min mit dem DNA-Farbstoff ToPro3, wie

oben für die Antikörper beschrieben, inkubiert. Die Deckgläschen wurden in einen Tropfen ProLong Gold-Mounting-Medium auf gereinigten Objektträgern eingebettet. Nach einem Tag war das Mounting-Medium bei Raumtemperatur auspolymerisiert und die Präparate konnten bis zur mikroskopischen Auswertung bei 4 °C aufbewahrt werden.

3.6 Konfokale Mikroskopie

Die Fluoreszenz-Mikroskopie ermöglicht es, zelluläre Strukturen vor einem schwarzen Hintergrund sichtbar zu machen, und so einen relativ scharfen Kontrast zu erzeugen. Bei der Weitfeld-Mikroskopie wird der Kontrast durch das Streulicht aus Ebenen, die oberhalb und unterhalb der Fokusebene liegen, verschlechtert. Im Weitfeld-Mikroskop entstandene Bilder haben deshalb neben dem eigentlichen Fluoreszenzsignal von Strukturen aus der Fokusebene ein recht starkes Hintergrundsignal.

Bei einem konfokalen Mikroskop verhindert eine vor dem Detektor konjugiert zur Fokusebene angeordnete Lochblende ("Pinhole"), dass das Licht aus anderen Ebenen als der Fokusebene detektiert wird. Die Verwendung eines Lasers als Lichtquelle für die gezielte Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen und der Einsatz von dichromatischen Teilerspiegeln (Hauptfarbteiler) stellen sicher, dass nur das vom Fluoreszenzfarbstoff emittierte, langwelligere Licht detektiert wird. Das kurzwelligere Laserlicht zur Anregung des Farbstoffes kann den dichromatischen Teilerspiegel nicht passieren. Außerdem verhindern Bandpassfilter, dass sich die emittierten Fluoreszenzsignale von Farbstoffen mit ähnlichen Fluoreszenzspektren überlagern. So erhält man ein kontrastreiches Bild mit hoher Auflösung.

Konfokalmikroskopische Bilder von fixierten, dreifachgefärbten Proben wurden mit einem 63x Plan-Apochromat-DIC-Ölimmersionsobjektiv mit einer numerischen Apertur von 1,4 im „Multi-Tracking“-Modus aufgenommen, d. h. die drei Kanäle wurden nacheinander aufgenommen, um ein „Durchbluten“ von einzelnen Fluoreszenzfarbstoffen zu verhindern, was bei simultaner Anregung und Detektion der Farbstoffe geschehen kann. Der Durchmesser des „Pinholes“ in den einzelnen Kanälen entsprach jeweils einer „Airy Unit“.

Für die Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs FITC und von EGFP wurde die Wellenlänge 488 nm des Argon-Lasers (Leistung 30 mW) mit einem „Laseroutput“ von 35 % (entspricht einer Röhrenspannung von 5,5 A) und einer durch den AOTF geregelten Transmission von 5 %

benutzt. Als Emissionsfilter diente ein Bandpassfilter von 505 bis 530 nm. Für Rhodamin und Cy3 wurden der Helium-Neon-Laser1 (Leistung 1 mW) mit der Anregungswellenlänge 543 nm und einer Transmission von 50 %; sowie ein Bandpassfilter von 560 bis 615 nm benutzt, zur Detektion des DNA-Farbstoffs ToPro3 wurde der Helium-Neon-Laser2 (Leistung 5 mW) mit der Anregungswellenlänge 633 nm bei einer Transmission von 1 % und der Langpass für Wellenlängen oberhalb von 650 nm verwendet.

3.7 Lebendzellbeobachtungen

Zur Durchführung der Lebendzellbeobachtung wurden Zellen auf großen Deckgläschen mit einem Durchmesser von 42 mm (Saur Laborbedarf, Reutlingen) angezogen und einen Tag vor der Durchführung der FRAP- und FCS-Messungen mit einem Plasmid, das für ein EGFP-Fusionsprotein codiert, transfiziert, bzw. die Zellen, die das Protein EYFP-CENP-H stabil exprimierten, wurden ebenfalls auf großen Deckgläsern angezogen. Vor der Messung wurden die Deckgläser in eine Kammer zur Lebendzellbeobachtung (PeCon, Erbach-Bach) eingesetzt. Die Kammer wurde mit 1xPBS mit einem pH-Wert von 7,4 befüllt und in einen beheizbaren Objektisch eingespannt. Für die Messungen wurde das 40x Wasserimmersionsobjektiv mit Korrekturring zur Anpassung an die Stärke des Deckgläschens und einer numerischen Apertur von 1,2 benutzt. Auf das Objektiv wurde ein Heizring aufgesetzt. Die Lebendzellmessungen wurden bei 37 °C durchgeführt. Die tatsächliche Temperatur in der Probe wurde mit einem Infrarotthermometer überprüft.

3.8 FRAP-Messungen

3.8.1 Praktische Durchführung der FRAP-Messungen

FRAP-Experimente müssen zunächst in Vorversuchen an die Dynamik der zu untersuchenden Proteine angepasst werden (Ellenberg, Buchkapitel). Zeigt ein Protein eine hohe Dynamik, wie z. B. das Protein HP1 (Schmiedeberg *et al.*, 2004), so muss bei der Bildaufnahme auf eine hohe räumliche Auflösung verzichtet werden zu Gunsten einer sehr hohen Geschwindigkeit, um die Dynamik der Fluoreszenzerholung möglichst genau zu erfassen. Der Bleichvorgang selbst sollte möglichst kurz sein, um zu vermeiden, dass noch während des Bleichens schon ein signifikanter Austausch von Proteinen in der gebleichten Region stattfindet und so die Dynamik der Fluoreszenzerholung beeinflusst wird. Gleichzeitig ist darauf zu achten, dass die

Fluoreszenz in der Bleichregion möglichst bis auf das Niveau der Hintergrundfluoreszenz reduziert wird.

Abgesehen vom Protein EGFP-hMis12 in der Interphase und den EGFP-markierten Deletionsvarianten von CENP-B und CENP-C handelt es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten Proteinen um weniger mobile Strukturkomponenten der beiden Zellkernstrukturen Centromer-/Kinetochorkomplexe und PML-Kernkörperchen. So konnte eine etwas langsamere Bildaufnahmezeit gewählt werden. Dadurch war die Bildauflösung, trotz komplett geöffnetem „Pinhole“, relativ gut, was sich auf die räumliche Auflösung der recht kleinen Centromerbereiche positiv auswirkte.

Die FRAP-Messungen wurden mit der 488nm-Linie des Argon-Lasers durchgeführt. Die Laser-Transmission wurde auf 1 % reduziert, um ein zu starkes Ausbleichen der Probe bei der Bildakquisition zu vermeiden. Gleichzeitig wurde das „Pinhole“ vollständig geöffnet, um die Fluoreszenz in der gesamten Struktur auch oberhalb und unterhalb der konfokalen Ebene während des Bleichvorgangs vollständig zu zerstören und um nach dem Bleichen auch die Fluoreszenz aus anderen Ebenen als nur der konfokalen Ebene detektieren zu können. Vor allem beim Bleichen der Centromere konnte so das detektierte Fluoreszenzsignal der relativ kleinen Centromerstrukturen erhöht werden. Das verschlechterte Signal-zu-Rauschen-Verhältnis wurde in Kauf genommen, da hier nicht die hohe Auflösung der Struktur im Vordergrund stand, sondern die Menge der detektierten Fluoreszenzsignale.

Vor dem Bleichen wurden in Abhängigkeit vom jeweiligen FRAP-Experiment zwischen einem und zehn Bilder eines Zellkerns aufgenommen, um eine Referenz für die Verteilung der Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen zu haben. Die Dauer einer Bildakquisition während der Zeitserien betrug etwa 960 μ s.

Für den Bleichvorgang wurde die Transmission des Lasers auf 100 % erhöht, um effektiv die Fluoreszenz des EGFP in der für das Bleichen ausgewählten Region („Region of interest“, ROI) zu zerstören. In Vorversuchen wurde getestet, wie viele Iterationen im Bleichvorgang nötig sind, um die Fluoreszenz in der gebleichten Region möglichst vollständig zu zerstören. Die Anzahl der Iterationen lag bei den Centromer-FRAP-Versuchen bei 20, bei den PML-FRAP-Versuchen bei 30, da hier die Fluoreszenzintensität in den PML-Kernkörperchen deutlich höher war. In den Centromer-FRAP-Messungen über wenige Minuten wurden die Bilder der Zeitserie entweder ohne zeitliche Verzögerung aufgenommen (EGFP-hMis12, Deletionsvarianten von CENP-B und CENP-C), oder bei den Proteinen mit geringer Mobilität mit einem Warteintervall von 5 Sekunden.

In den Langzeit-FRAP-Messungen wurden mit einem Warteintervall von 60 min Z-Stapel von den Zellkernen, in denen gebleichen wurde, akquiriert, da die Bewegung der Zellen über den langen Beobachtungszeitraum relativ groß war. Für die quantitative Bildauswertung wurden die korrespondierenden Ebenen aus den Z-Stapeln selektiert.

In den Bleichexperimenten mit den EGFP-markierten PML-Isoformen wurden Zeitserien von 200 Bildern mit einem Warteintervall von 5 Sekunden generiert. Das entspricht einem Beobachtungszeitraum von etwa 20 min.

3.8.2 Quantitative Auswertung der FRAP-Messungen

Die quantitative Auswertung zur Bestimmung der relativen Fluoreszenzintensitäten in den gebleichten Bereichen wurde nach Chen und Huang (2001) durchgeführt. Zur Korrektur der Fluoreszenzintensität wurde der Fluoreszenzintensitätsverlust während der Bildaufnahme, sowie die Hintergrundfluoreszenz berücksichtigt. Dazu wurde die Fluoreszenz in einem Bereich außerhalb der Zelle bestimmt und subtrahiert. So konnte die relative Fluoreszenzintensität (RFI) zu jedem Zeitpunkt der Bildaufnahme bestimmt werden,

$$RFI = \frac{\left(\frac{I_{b_t}}{I_{l_t}} \right)}{\left(\frac{I_{b_0}}{I_{l_0}} \right)} \quad (5)$$

wobei I_{b_t} der Fluoreszenzintensität des gebleichten Bereiches zu den Bildaufnahme-Zeitpunkten t entspricht, I_{l_t} der Fluoreszenzintensität in einem ungebleichten Referenzbereich zu den Zeitpunkten t und I_{b_0} und I_{l_0} jeweils der mittleren Fluoreszenzintensität in beiden Bereichen vor dem Bleichen. Erreicht die relative Fluoreszenzintensität den Wert 1, so hat sich die Fluoreszenz im gebleichten Bereich zu diesem Zeitpunkt komplett erholt. Erreicht die Kurve in der grafischen Darstellung der Fluoreszenzerholung ein Plateau bei einem niedrigeren Wert als 1, gibt es eine im Beobachtungszeitraum immobile Fraktion (IF) des untersuchten Proteins, die in diesem Zeitraum nicht ausgetauscht wird.

Um einen Vergleich der mobilen Fraktionen von untersuchten Proteinen zu ermöglichen, wird auch die Halberholzeit $t_{1/2}$ bestimmt, bei der 50 % der relativen Fluoreszenzintensität der mobilen Fraktion erreicht sind. Die $t_{1/2}$ wird berechnet nach

$$t_{1/2} = t((F_{\infty} - F_0) \cdot 0,5) - t(F_0), \quad (6)$$

dabei entspricht F_0 dem Fluoreszenzminimum zum Zeitpunkt t_0 und F_∞ dem Fluoreszenzplateau, das am Ende des Beobachtungszeitraumes erreicht wird.

Mit Hilfe von linearer Regression wurde außerdem für die in Langzeit-FRAP-Experimenten untersuchten inneren Kinetochorproteine eine theoretische Fluoreszenzhalberholzeit berechnet, da im Beobachtungszeitraum in den Experimenten selber kein Plateau der Fluoreszenzerholung erreicht wurde.

3.9 FCS-Messungen

3.9.1 Praktische Durchführung der FCS-Experimente

Vor jeder FCS-Messung in lebenden Zellen musste zunächst der Messaufbau für die FCS-Messung mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes in Lösung kalibriert werden. Dazu wurde eine 10^{-8} M Alexa 488-Lösung (Molecular Probes, Eugene, USA) benutzt, um das FCS-„Pinhole“ in x-, y- und z-Richtung so zu justieren, dass Intensitätsmaxima am Detektor gemessen wurden. Außerdem wurde die Position des konfokalen FCS-Detektionsvolumen durch starkes Photobleichen an einer Stelle in einer fluoreszierenden Klebstoffschicht (zur Verfügung gestellt von Zeiss, Jena) bestimmt, die dann als Loch im Fluoreszenzbild des LSM-Modus visualisiert werden konnte. So konnte die Position, an der die FCS-Messung durchgeführt werden sollte, in den Zellkernen relativ genau bestimmt werden.

Die Messungen wurden mit der 488 nm-Linie des Argon-Lasers durchgeführt mit einer sehr geringen Transmission von 0,1 %, um Photobleichen während der Messung zu verhindern. Vor den Detektor wurde ein Langpass-Filter eingesetzt, der nur Wellenlinien oberhalb von 505 nm passieren lässt. Eine einzelne FCS-Messung dauerte 10 Sekunden, es wurden in einem FCS-Experiment in einem Zellkern dreimal zehn Messungen durchgeführt, bevor die nächste Zelle gesucht wurde.

3.9.2 Auswertung der Autokorrelationskurven

Zur Auswertung der Autokorrelationskurven aus den FCS-Messungen wurden diese in der LSM-Software ausgewählt und in die Datenkalkulationssoftware Origin (Version 7.0) importiert. Nach der Prozessierung der importierten Daten wurde eine gemittelte Autokorrelationskurve aus diesen gemessenen Daten an ein mathematisches Modell, das die Diffusion beschreibt und das auch eine Triplettfunktion enthält, angepasst. In dieser Arbeit wurde zur Datenanpassung nur das Modell für anomale Diffusion angewendet, da die

Anpassung mit einem Modell für freie Diffusion mit einer oder zwei Komponenten nicht erfolgreich war. Die besten Ergebnisse lieferte das Modell für anomale Diffusion, auch wenn in den „Residuals plots“ dieser Anpassungen eine Amplitude, wenn auch mit sehr geringem Ausschlag, um den Mittelwert der angepassten Kurve schwingt und so darauf hindeutet, dass das angenommene Modell die gemessenen Daten auch noch nicht ganz genau beschreiben kann (siehe Abb. 4.14, A). Die analytische Funktion für das Modell lautet:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \left(1 + \frac{F \cdot e^{-\tau/\tau_F}}{1-F} \right) \cdot \left(\frac{1}{\left(1 + \left(\frac{\tau}{\tau_A} \right)^\alpha \right) \cdot \left(1 + \left(\frac{\tau}{\tau_A} \right)^\alpha \cdot \frac{1}{S^2} \right)^{1/2}} \right) \quad (7)$$

mit N als Anzahl der Partikel und F als Triplettfunktion. τ_F und τ_A entsprechen der Triplettzeit und der anomalen Diffusionszeit. τ ist die Korrelationszeit und S der Strukturparameter mit $S=W_0/Z_0$, wobei W_0 dem Radius und Z_0 der halben Höhe des konfokalen Volumens, für das angenähert die Form eines Zylinders angenommen wird. Das Modell wird ausführlich beschrieben in Schwille *et al.* (1999) und Saxton (2001).

Das Modell der anomalen Diffusion beschreibt eine gehinderte Diffusion von Molekülen, wie sie für die Umgebung in einem Zellkern angenommen werden kann. Im Zellkern kann die Diffusion durch Hindernisse, sowie durch Bindungen und Interaktionen der Proteine behindert sein. Das mittlere Verschiebungsquadrat $\langle r^2 \rangle$, das bei freier Diffusion proportional der Zeit ist ($\langle r^2 \rangle = 4Dt$), erreicht bei irgendwie eingeschränkter Diffusion bei größeren Zeiten nicht so hohe Werte wie bei freier Diffusion. Diese anomale Diffusion kann durch die Einführung eines Anomalieparameters oft hinreichend gut beschrieben werden durch $\langle r^2 \rangle = \Gamma t^\alpha$, $\alpha < 1$, wobei α der Anomalieparameter ist und Γ der Transportkoeffizient. Ist nicht die Umgebung bei einer Messung uneinheitlich, sondern die Population der diffundierenden Teilchen darin, liegt ebenfalls eine anomale, bzw. vielkomponentige Diffusion vor (K. Bacia, Diplomarbeit, 2001). Insgesamt versucht das Modell für anomale Diffusion das Auftreten vieler verschiedener Diffusionszeiten zu beschreiben. Die Diffusionskoeffizienten für die anomale Diffusion wurden berechnet nach

$$W_0^2 = 4D\tau_{Diff}^\alpha \quad (8)$$

4 Ergebnisse

Unter der generellen Fragestellung, wie die strukturelle und zeitliche Organisation eines Zellkerns die Funktion des Genoms beeinflusst, sollte in der vorliegenden Arbeit die Mobilität von Proteinen, die am Aufbau von zwei unterschiedlichen nukleären Domänen, den Kinetochoren und den PML-Kernkörperchen, beteiligt sind, untersucht werden. Beide Zellkernstrukturen sind während des gesamten Zellzyklus in den Zellen höherer Eukaryoten zu finden. Während die Funktion der Centromer-/Kinetochorbereiche darin liegt, die korrekte Aufteilung der Chromosomen auf die beiden Tochterzellen in der Zellteilung zu gewährleisten, ist die genaue Funktion der PML-Kernkörperchen noch nicht bekannt.

Zur Durchführung der Versuche wurde zunächst das Verhalten von entsprechenden EGFP-Fusionsproteinen mit dem der endogenen Proteine in zellbiologischen und biochemischen Experimenten verglichen. Mit Hilfe der Fluoreszenztechniken FRAP und FCS wurde dann das dynamische Verhalten dieser EGFP-Fusionsproteine in lebenden Wirbeltierzellen qualitativ und quantitativ analysiert, z.T. in Abhängigkeit vom Zellzyklusstadium. In einem dritten Ansatz wurde untersucht, ob die PML-Kernkörperchen selbst nach der Induktion von DNA-Schäden zu einer dynamischen Struktur werden und eine Funktion in der DNA-Reparatur durch eine räumliche Assoziation mit den Orten der DNA-Schäden ausüben.

4.1 *Das dynamische Verhalten der Proteine des inneren Kinetochors während der Interphase und Mitose*

Die Proteine des inneren Kinetochors, CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-H, CENP-I und hMis12 bilden einen Proteinkomplex aus, der während der Interphase den Centromer-/Kinetochorbereich auf den Chromosomen markiert und dessen Aufrechterhaltung gewährleisten muss. In der Mitose dient er als Ankerpunkt für den Aufbau eines funktionsfähigen Kinetochors, an welches schließlich die Mikrotubuli anbinden können. Seit einigen Monaten sind weitere Proteine des inneren Kinetochors bekannt (Okada *et al.*, 2006), die aber aus zeitlichen Gründen nicht Eingang in diese Untersuchungen finden konnten. Mittels exogen eingebrachter EGFP-Fusionsproteine der genannten sechs inneren Kinetochorproteine wurde hier erstmals ihr dynamisches Verhalten in Interphase und Mitose untersucht.

4.1.1 Charakterisierung der EGFP-Fusionsproteine des inneren Kinetochors nach subnukleärer Lokalisation und Expressionslänge

Die EGFP-Fusionsproteine der inneren Kinetochorproteine CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-I und hMis12 wurden zunächst transient in HEp-2-Zellen transfiziert. Außerdem wurde in den Lebendzellversuchen eine das Fusionsprotein YFP-CENP-H stabil exprimierende Hela-Zelllinie (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von I. Cheeseman) eingesetzt.

In indirekten Immunfluoreszenz-Experimenten wurde die Lokalisation der exogen eingebrachten Fusionsproteine mit der der endogenen inneren Kinetochorproteine CENP-A, bzw. CENP-C, die durch spezifische Antikörperfärbungen visualisiert wurden, verglichen (Abb. 4.1 und 4.2). Außerdem wurden Proteinlysate der transfizierten Zellen im Western Blot analysiert, um die Expressionslänge der Fusionsproteine zu überprüfen (ebenfalls Abb. 4.1 und 4.2). In den Kolo-kalisationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass alle EGFP-Fusionsproteine der inneren Kinetochorproteine CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-H, CENP-I und hMis12 in der Interphase und auch in der Mitose am Centromer-/Kinetochorbereich im Zellkern von HEp-2- bzw. Hela-Zellen lokalisieren. Da der monoklonale Anti-CENP-A-Antikörper auch das exogene Protein EGFP-CENP-A erkennt und so auf jeden Fall eine vollständige Kolo-kalisation zeigt (Abb. 4.1, A, 2. u. 3. Reihe), wurde hier zusätzlich ein Antikörper gegen CENP-C eingesetzt, der ebenfalls komplette Kolo-kalisation zwischen CENP-C (rot) und EGFP-CENP-A (grün) zeigte (Abb. 4.1, A, 1. Reihe).

EGFP-CENP-B lokalisiert nicht nur direkt im Centromerbereich, sondern auch, wie bereits früher beschrieben (Amor *et al.*, 2004), in den heterochromatischen Bereichen, die den Centromerbereich umgeben. Die Alpha-Satelliten-DNA in diesen Bereichen enthält ebenfalls die zur Bindung von CENP-B benötigten CENP-B-Boxen. Besonders deutlich wird dieser größere Bereich, in dem EGFP-CENP-B lokalisiert, in mitotischen Zellen. Hier scheint EGFP-CENP-B die eigentlichen Centromerbereiche, dargestellt durch die rote Anfärbung von CENP-A auf der rechten und linken Seite der Metaphaseplatte, wie ein grüner Balken regelrecht miteinander zu verbinden (Abb. 4.1, B).

Die Fusionsproteine EGFP-CENP-C (Abb. 4.1, C), EYFP-CENP-H (Abb. 4.2, A) und EGFP-CENP-I (Abb. 4.2, B) zeigen eine komplette Kolo-kalisation mit der Antikörperfärbung gegen CENP-A.

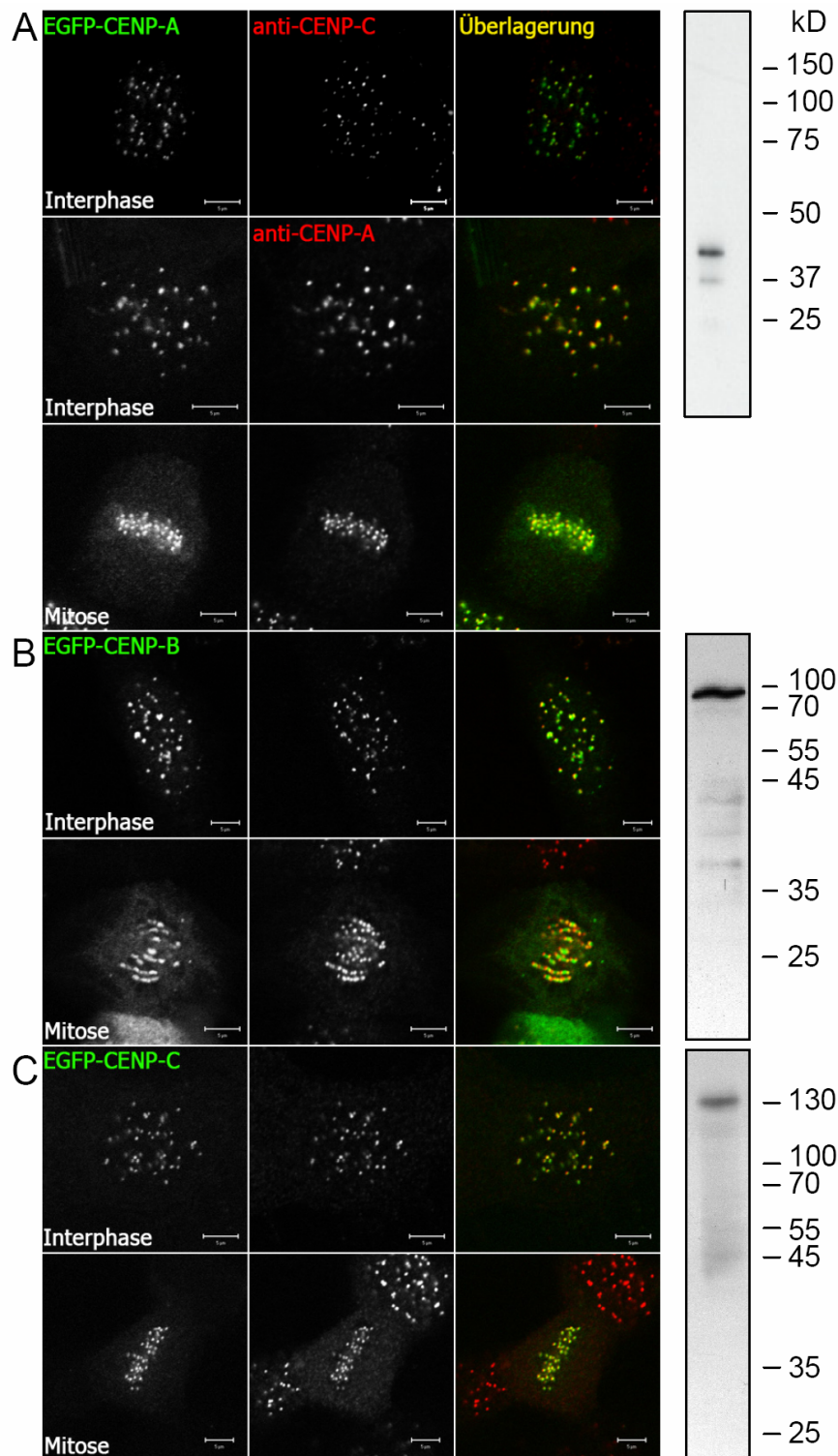


Abb. 4.1: Lokalisation der EGFP-Fusionsproteine von CENP-A, -B und -C während der Interphase und Mitose in Hep-2-Zellen. Hep-2-Zellen wurden mit Plasmiden, die für die EGFP-Fusionsproteine EGFP-CENP-A, EGFP-CENP-B, EGFP-CENP-C codieren, transient transfiziert. 24 Stunden danach wurden die Zellen fixiert. In einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung wurde das endogene Centromerprotein CENP-A, bzw. auch CENP-C im Fall der EGFP-CENP-A exprimierenden Zellen, angefärbt (rot) und mit der Lokalisation der exogenen EGFP-Fusionsproteine (grün) verglichen. Die Überlagerung beider konfokalmikroskopischer Aufnahmen (rechts) zeigt die Kolo-kalisation der exogenen und endogenen Proteine im Centromerbereich der Zellen in der Interphase und der Mitose. Größenbalken: 5µm. Mit Proteinlysaten der transfizierten Zellen wurden Western Blots durchgeführt, um mit Hilfe eines Anti-GFP-Antikörpers die Expressionslänge der EGFP-Fusionsproteine zu überprüfen. (theoretische Proteingrößen: EGFP-CENP-A: 43 kD; EGFP-CENP-B: 92 kD; EGFP-CENP-C: 133 kD)

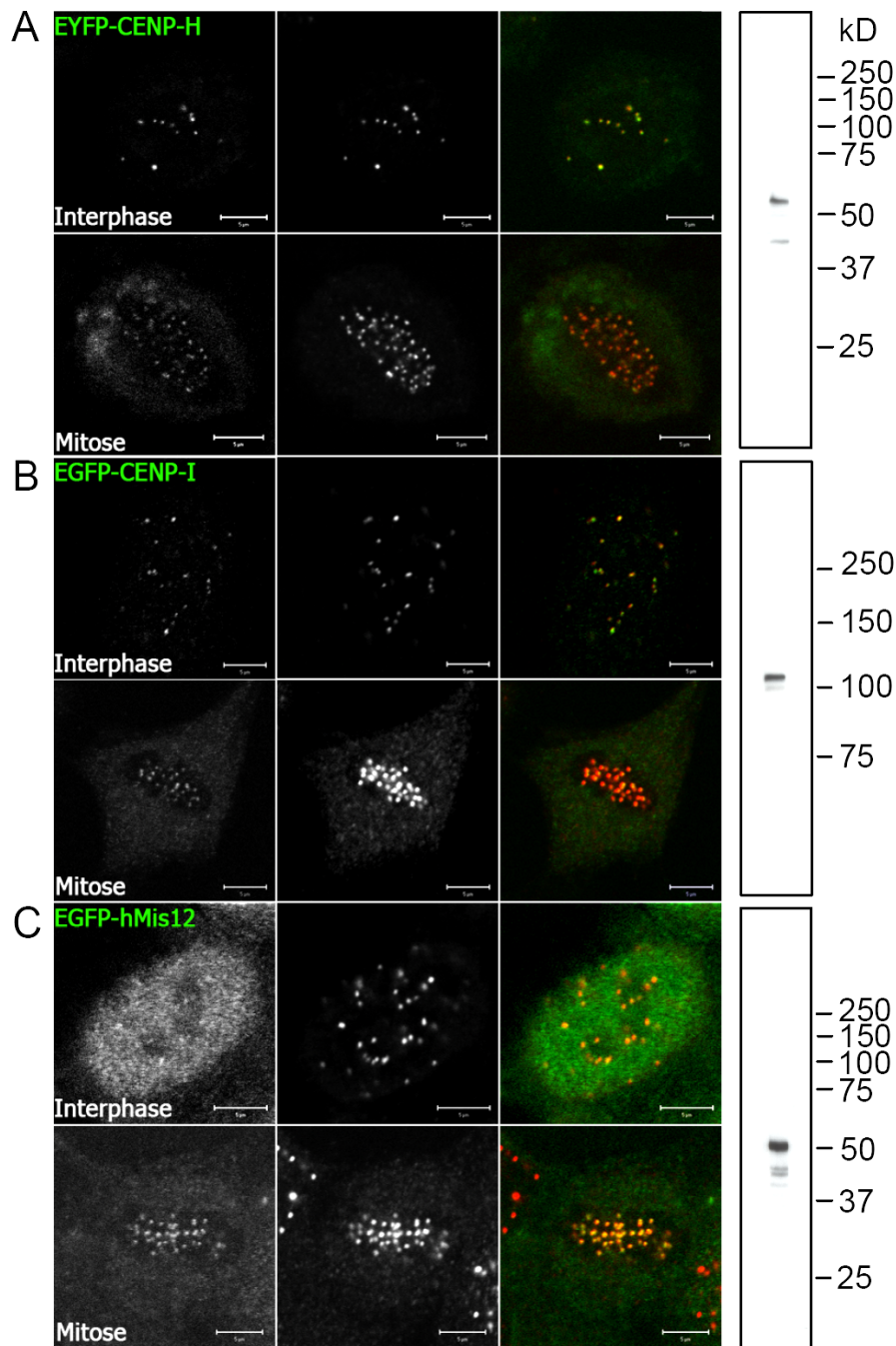


Abb. 4.2: Lokalisation der EGFP-Fusionsproteine von CENP-H, -I und hMis12 während der Interphase und Mitose in HEp-2-, bzw. Hela-Zellen. HEp-2-Zellen wurden mit Plasmiden, die für die EGFP-Fusionsproteine EGFP-CENP-I und EGFP-hMis12 codieren, transient transfiziert. 24 Stunden danach wurden die Zellen fixiert, ebenso wurden Zellen einer das Fusionsprotein EYFP-CENP-H stabil exprimierenden Hela-Zelllinie fixiert. In einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung wurde auch hier das endogene Centromerprotein CENP-A angefärbt (rot) und mit der Lokalisation der exogenen EGFP-Fusionsproteine (grün) verglichen. Die Überlagerung beider konfokalmikroskopischer Aufnahmen (rechts) zeigt die Koloalisation der exogenen und endogenen Proteine im Centromerbereich der Zellen in der Interphase und in der Mitose. Größenbalken: 5μm. Mit Proteinlysaten der transfizierten Zellen wurden Western Blots durchgeführt, um mit Hilfe eines Anti-GFP-Antikörpers die Expressionslänge der EGFP-Fusionsproteine zu überprüfen. (theoretische Proteingrößen: EYFP-CENP-H: 54 kD; EGFP-CENP-I: 113 kD; EGFP-hMis12: 51 kD)

Wie schon früher gezeigt (Goshima *et al.*, 2003; Kline *et al.*, 2006) lokalisiert das Kinetochorprotein hMis12 in den fixierten Interphasezellen nur schwach am Centromer-/Kinetochorbereich, zusätzlich zu einer im Vergleich zu den anderen exprimierten Kinetochorproteinen relativ starken nukleoplasmatischen Färbung (Abb. 4.2, C). In einigen Interphasezellen wurde nur diese nukleoplasmatische Färbung beobachtet und keine Lokalisation am Centromer-/Kinetochorbereich (nicht gezeigt). In mitotischen Zellen ist das EGFP-hMis-Signal hingegen stärker und zeigt vollständige Koloalisation mit dem endogenen CENP-A. In den Western-Blot-Experimenten wurde belegt, dass die EGFP-Fusionsproteine in den erwarteten Größen in den Zellen exprimiert werden (Abb. 4.1 und 4.2, rechte Spalte).

Bei Expression dieser Proteine in den erwarteten Größen deutet die korrekte Lokalisation der Fusionsproteine EGFP-CENP-A, EGFP-CENP-B, EGFP-CENP-C, EYFP-CENP-H, EGFP-CENP-I und EGFP-hMis12 am Centromer-/Kinetochorbereich während der Interphase und der Mitose darauf hin, dass sich die Fusionsproteine ähnlich - oder gleich - den endogenen Proteinen verhalten.

4.1.2 Mobilität der EGFP-Fusionsproteine des inneren Kinetochors

Mit Hilfe der Fluoreszenztechniken FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching) und FCS (Fluorescence correlation spectroscopy) sollte das dynamische Verhalten der inneren Kinetochorproteine am Kinetochor selbst und im Nukleoplasma lebender humaner Zellen während der Interphase und der Mitose untersucht werden. Bei der FRAP-Technik wird die Fluoreszenz in einem ausgewählten Bereich einer ein EGFP-Protein exprimierenden Zelle irreversibel geblichen und anschließend die Erholung der Fluoreszenz in diesem Bereich beobachtet. Mit diesem Verfahren können Aussagen über die Mobilität dieses EGFP-Proteins in diesem Zellbereich gemacht werden (Phair und Misteli, 2001).

Im FCS-Experiment werden Fluoreszenzfluktuationen detektiert, die durch Molekülbewegungen in einem kleinen konfokalen Volumen in Bereichen geringer Fluoreszenzintensität zustande kommen. Durch die anschließende Autokorrelation des detektierten Signals erhält man Informationen über die Beweglichkeit der fluoreszenzmarkierten Proteine (Bacia und Schwille, 2003).

4.1.2.1 FRAP-Messungen der inneren Kinetochorproteine im Minutenbereich

In den FRAP-Experimenten wurden transient oder stabil transfizierte Zellen ausgewählt, in denen die unterschiedlichen EGFP-Fusionsproteine des inneren Kinetochors moderat exprimiert wurden. Diese Zellen zeigten ein normales Verhalten in der Zellteilung und waren somit offensichtlich durch die Expression des jeweiligen Fusionsproteins nicht im Ablauf des Zellzyklus beeinträchtigt. Bis zu drei Centromere eines Zellkerns in Interphase-Zellen, bzw. die halbe Metaphase-Platte einer mitotischen Zelle wurden mit hoher Laserintensität irreversibel gebleicht. Die Parameter für den Bleichvorgang wurden so gewählt, dass die Fluoreszenz im gebleichten Bereich in der ersten Aufnahme nach dem Bleichen ungefähr der Hintergrundfluoreszenz im gesamten Bildausschnitt entsprach. Vor und nach dem Bleichvorgang wurden in einer Zeitreihe konfokalmikroskopische Aufnahmen des Zellkerns, bzw. der mitotischen Zelle gemacht, um die Erholung der Fluoreszenz in den gebleichten Bereichen zu messen und quantitativ auswerten zu können.

Während die mikroskopischen Aufnahmen von EGFP-CENP-A keine Fluoreszenzerholung im Bereich der gebleichten Centromere in der Interphase-Zelle und dem gebleichten Bereich der Metaphaseplatte in der mitotischen Zelle erkennen lassen (Abb. 4.3, A), zeigt die quantitative Auswertung des FRAP-Experimentes eine sehr geringe Fluoreszenzerholung im Zeitraum über 100 Sekunden (Abb. 4.5, A). Damit zeigt die Histonvariante CENP-A, die das Histon H3 im Centromerbereich ersetzt, eine ähnliche Dynamik wie das Histon H3 selbst (Kimura und Cook, 2001). Zusätzlich gibt es noch einen sehr kleinen Anteil an freiem EGFP-CENP-A, der die geringe Fluoreszenzerholung in den gebleichten Bereichen möglich macht. EGFP-CENP-B zeigt in der Interphase ein ähnlich immobiles Verhalten wie EGFP-CENP-A (Abb. 4.5, B) mit einem ebenfalls geringen Anteil von mobilem EGFP-CENP-B, der etwa 10% beträgt. In den mitotischen Zellen vergrößert sich der Anteil des mobilen EGFP-CENP-B auf etwa 40%. Dieser mobile Anteil zeigt eine relativ schnelle Fluoreszenzerholung innerhalb der ersten 15 s. Allerdings kehrt die Fluoreszenz nicht an den distinkten Punkten, die die Centromere kennzeichnen, zurück, sondern verteilt sich diffus im gesamten, gebleichten Bereich der Metaphaseplatte (Abb. 4.3, B, untere Reihe). Das spricht für einen höheren Anteil an freiem EGFP-CENP-B in den mitotischen Zellen.

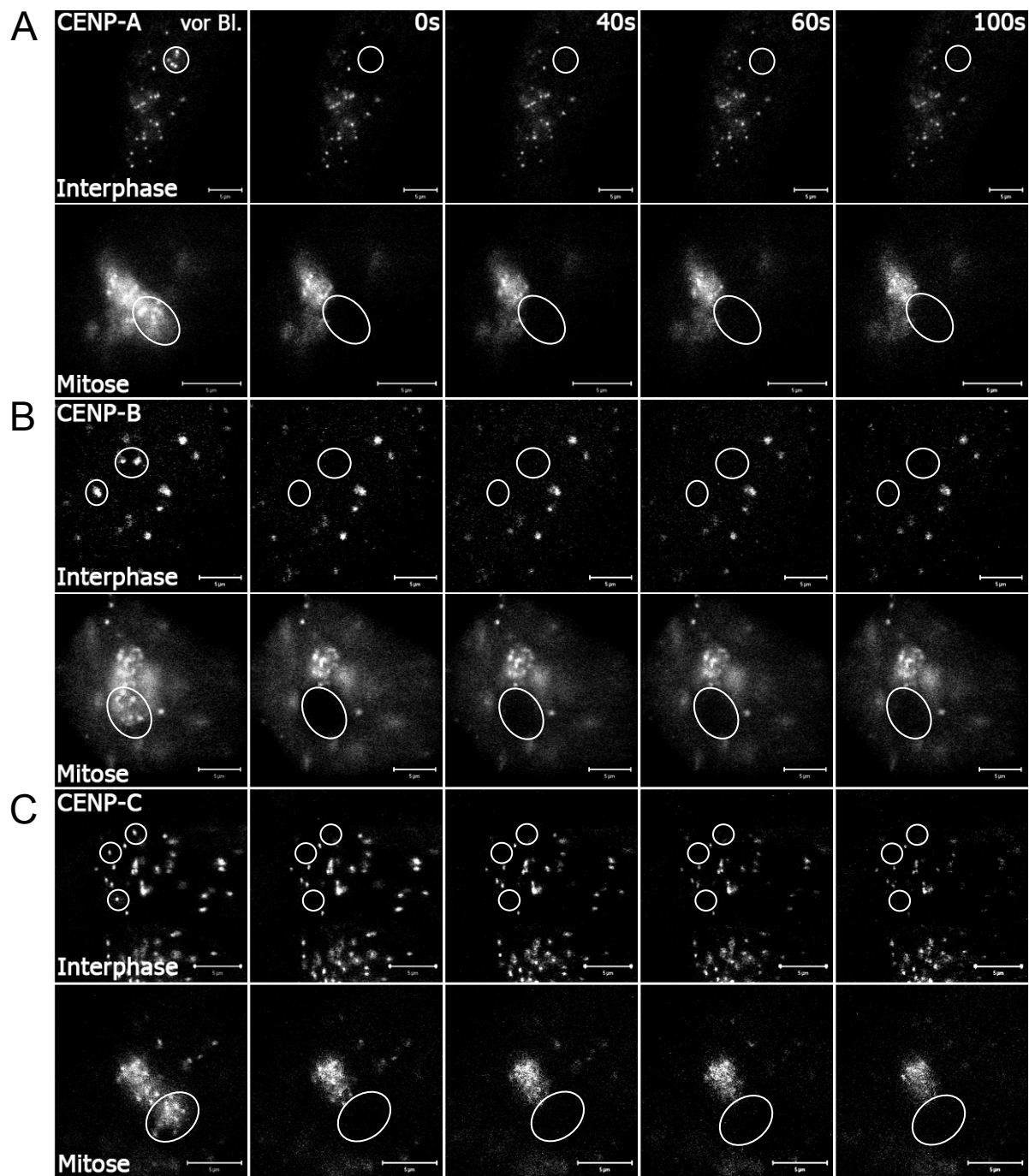


Abb. 4.3: FRAP-Messungen in EGFP-CENP-A, -CENP-B und -CENP-C exprimierenden HEp-2-Zellen in Interphase und Mitose. Gezeigt sind jeweils ein Bild vor dem Bleichen („vor Bl.“), das erste Bild nach dem Bleichvorgang zum Zeitpunkt 0 Sekunden und aus den Zeitserien ausgewählte Aufnahmen zu den Zeitpunkten 40, 60, und 100 Sekunden nach dem Bleichen. Geblichen wurde in den weiß-umrandeten Regionen. Größenbalken: 5 µm.

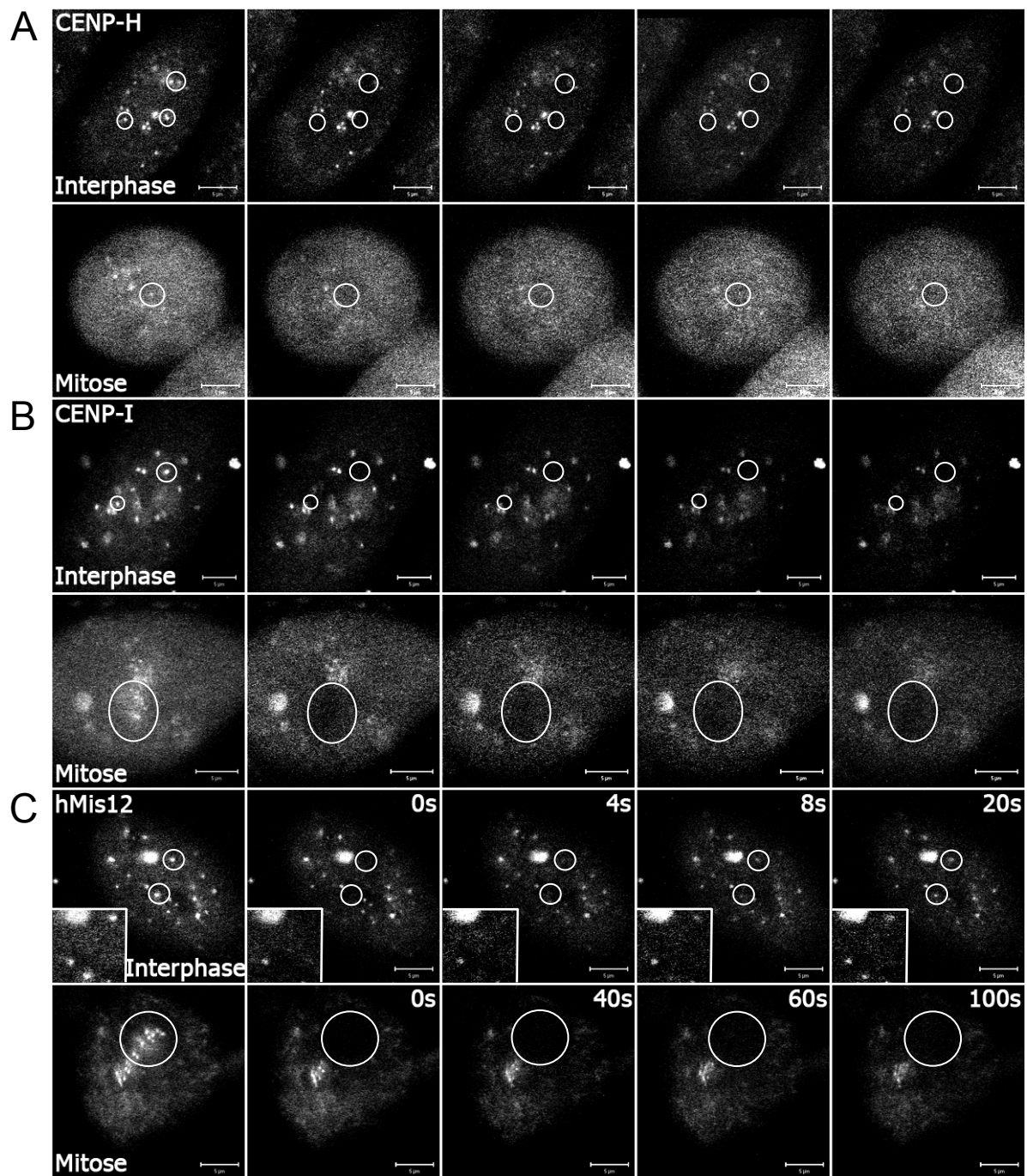


Abb. 4.4: FRAP-Messungen in EYFP-CENP-H exprimierenden Hela-Zellen, bzw. EGFP-CENP-I und -hMis12 exprimierenden HEp-2-Zellen in Interphase und Mitose. Gezeigt sind jeweils ein Bild vor dem Bleichen („vor Bl.“), das erste Bild nach dem Bleichvorgang zum Zeitpunkt 0 Sekunden und aus den Zeitserien ausgewählte Aufnahmen zu den Zeitpunkten 40, 60, und 100 Sekunden nach dem Bleichen, bzw. bei hMis12 in der Interphase 4, 8, und 20 Sekunden danach. Geblichen wurde auch hier in den weiß-umrandeten Regionen. Größenbalken: 5 µm.

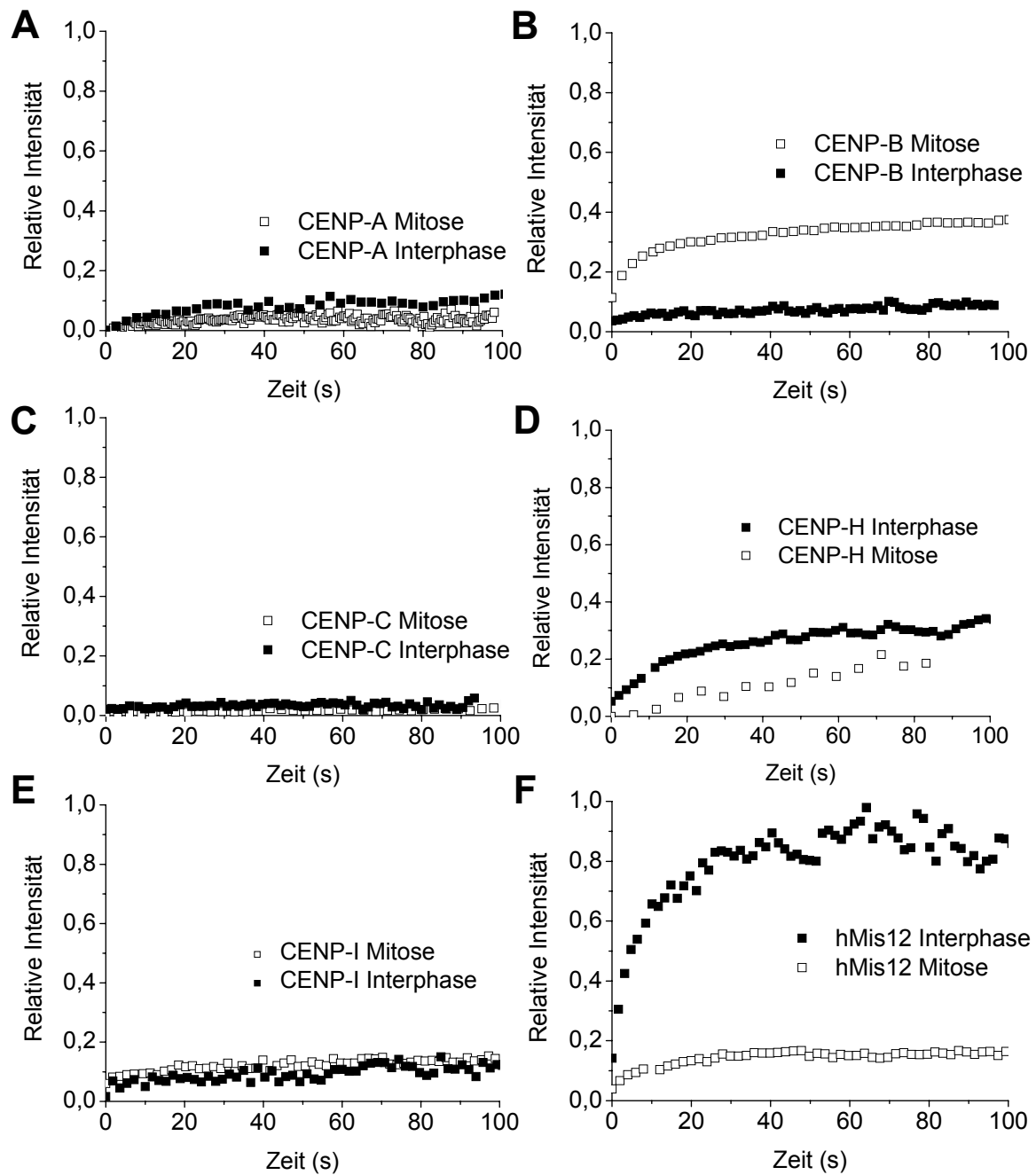


Abb. 4.5: Quantitative Auswertung der FRAP-Messungen in der Interphase und Mitose. Dargestellt ist die Veränderung der relativen Fluoreszenzintensität vom Zeitpunkt 0 Sekunden bis zu 100 Sekunden nach dem Bleichen in der Interphase (gefüllte Kästchen) und der Mitose (leere Kästchen) humaner Zellen. Der Fehler betrug bei allen Messwerten ungefähr 5%, bei hMis12 in der Interphase 10%. (Interphase: N=15; Mitose: N=5)

Das Protein EGFP-CENP-C zeigt auch in der quantitativen Analyse der FRAP-Experimente keine Fluoreszenzerholung in den gebleichten Bereichen. Somit ist die gesamte Menge an exprimiertem EGFP-CENP-C im Centromerbereich immobilisiert (Abb. 4.3 C sowie Abb. 4.5, C). Das stabil in Hela-Zellen exprimierte Fusionsprotein EYFP-CENP-H zeigt eine leichte Fluoreszenzerholung von 30 % in den gebleichten Bereichen, der überwiegende Anteil des Proteins wird aber in Interphase und Mitose am Centromer direkt nicht ausgetauscht (Abb. 4.5, D). Ähnlich wie bei EGFP-CENP-A zeigen die mikroskopischen Aufnahmen EGFP-CENP-I-exprimierender Zellen keine Fluoreszenzerholung während der Interphase und der Mitose (Abb. 4.4, B). Die quantitative Auswertung zeigt hingegen einen geringen aber signifikanten Anteil mobilen EGFP-CENP-I-Proteins von ca. 10 % (Abb. 4.5, E).

Das Protein EGFP-hMis12 verhielt sich im FRAP-Experiment stark abweichend von allen anderen hier untersuchten EGFP-Fusionsproteinen des inneren Kinetochors. In der Interphase kann man eine sehr schnelle Fluoreszenzerholung an den gebleichten Centromeren beobachten (Abb. 4.4, C) mit einer mittleren Halberholzeit ($t_{1/2}$) von 4,8 s. Im Beobachtungszeitraum von 60 s ist die Fluoreszenz vollständig zurückgekehrt. Innerhalb dieses Zeitraumes findet also ein vollständiger Austausch des am Centromer gebundenen EGFP-hMis12 statt (Abb. 4.5, F). In der Mitose hingegen beobachtet man keine Fluoreszenzerholung im gebleichten Bereich. Es findet offensichtlich eine Immobilisierung des Proteins an den Kinetochoren während der Mitose statt.

4.1.2.2 FRAP-Messungen von Deletionsvarianten der inneren Kinetochorproteine CENP-B und CENP-C

Um den Mechanismus der sehr stabilen Bindung der Proteine CENP-B und CENP-C am Centromerbereich zu untersuchen, wurden auch FRAP-Messungen mit EGFP-markierten Deletionsvarianten dieser Proteine, die nur einzelne Domänen der Proteine enthielten, durchgeführt (Abb. 4.6).

Das Protein CENP-B besitzt im N-terminalen Bereich eine DNA-Bindedomäne (Aminosäuren 2-169), die an die CENP-B-Box der α -Satelliten-DNA im Chromatin des Centromerbereichs binden kann (Shelby *et al.*, 1996). Diese uns zur Verfügung gestellte CENP-B-DNA-Bindedomäne (CENP-B-DBD), die an den N-Terminus von GFP fusioniert vorliegt (Shelby *et al.*, 1996), wurde zur Durchführung der FRAP-Experimente eingesetzt, nachdem im indirekten Immunfluoreszenz-Experiment die Lokalisation am Centromer bestätigt wurde (Abb. 4.7, A).

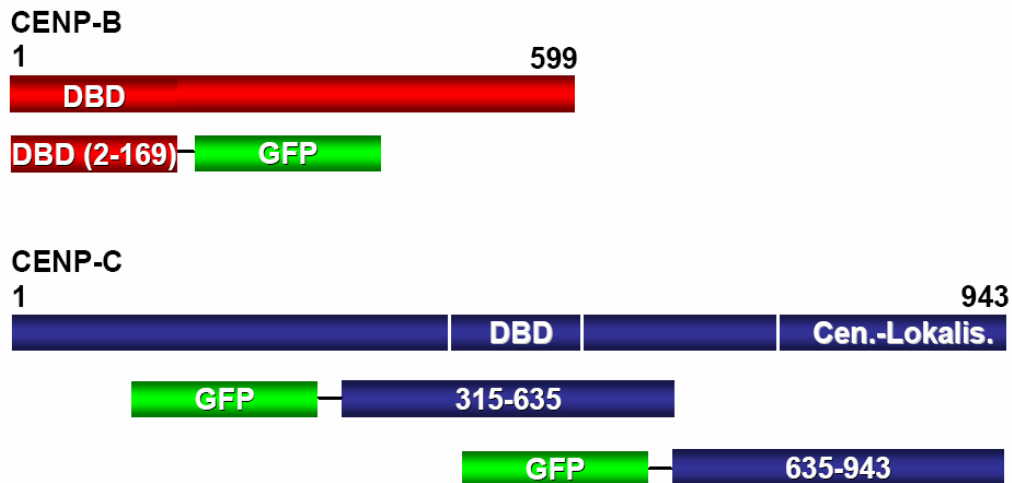


Abb. 4.6: Domänenstruktur der Kinetochorproteine CENP-B und CENP-C. Das Protein CENP-B hat im N-terminalen Bereich eine DNA-Bindedomäne (DBD). Dieser N-terminale Bereich wurde an den N-Terminus von GFP fusioniert. CENP-C hat eine DNA-Bindedomäne im mittleren Bereich, die, ebenso wie die C-terminale Centromer-Lokalisationsdomäne (Cen.-Lokalis.) des Proteins, für eine Lokalisation dieser CENP-C-Fragmente ans Centromer ausreichend ist. Die CENP-C-Fragmente wurden an den C-Terminus des GFP-Proteins fusioniert.

Auf vorhergehenden Untersuchungen basierend (Lanini und McKeon, 1995; Yang *et al.*, 1996; Sugimoto *et al.*, 1997; Trazzi *et al.*, 2002) wurden von I. Erliandri in unserer Gruppe unterschiedliche EGFP-fusionierte CENP-C-Deletionsvarianten hergestellt. Die CENP-C-Konstrukte bestehend aus dem mittleren Teil des Proteins (Aminosäure 315-635) und dem C-terminalen Anteil (Aminosäure 635-943) lokalisieren am Centromer, wie in indirekten Immunfluoreszenz-Experimenten gezeigt wurde (Abb. 4.7, D und G). Zusätzlich lokalisiert der mittlere Teil von CENP-C, auch bei geringer Expression, im Nukleolus. Der C-terminale Teil von CENP-C lokalisiert nur schwach an den Centromeren und zeigt als EGFP-CENP-C(635-943) auch eine starke nukleoplasmatische Färbung (Abb. 4.7, D). Die Parameter für die FRAP-Experimente wurden genauso gewählt wie für die in voller Länge exprimierten Proteine des inneren Kinetochors. Die Fluoreszenzerholung in den gebleichten Bereichen wurde über 50 bis 100 Sekunden beobachtet und quantitativ ausgewertet.

Die isolierte DNA-Bindedomäne von CENP-B zeigt hier als EGFP-CENP-B-DBD im FRAP-Experiment sowohl in der Interphase als auch in der Mitose eine rasche, zweiphasische Fluoreszenzerholung an den Centromeren (Abb. 4.7, C). Innerhalb der ersten 15 s kehren etwa 40% der Fluoreszenz im gebleichten Bereich zurück, danach erfolgt eine langsamere Fluoreszenzerholung, die nach dem Beobachtungszeitraum von 100 s noch nicht abgeschlossen ist. Dieses Verhalten der CENP-B-DNA-Bindedomäne ähnelt somit in seiner Dynamik dem Verhalten der mobilen Population des vollständigen CENP-B-Proteins in mitotischen Zellen (Abb. 4.5, B).

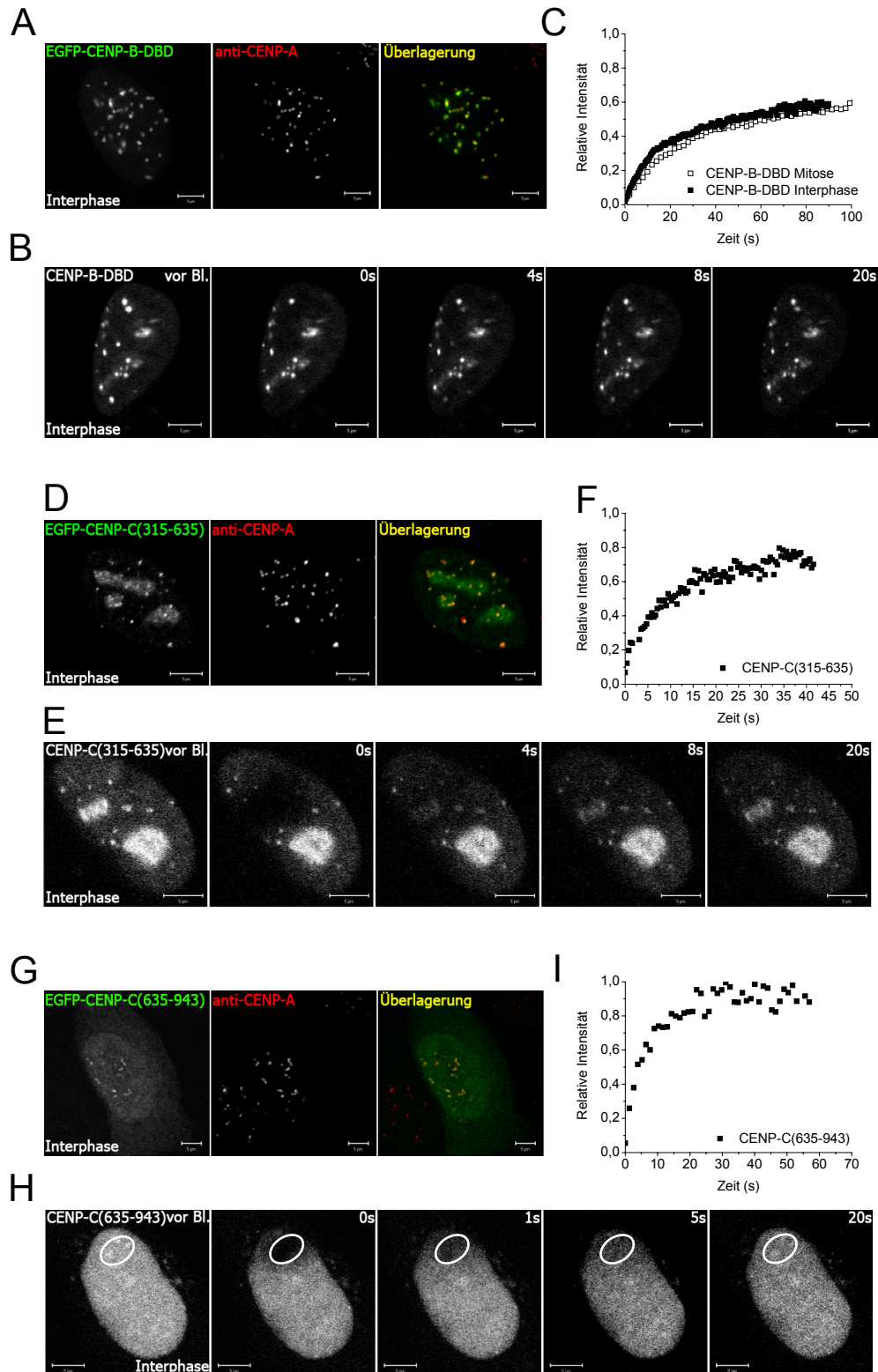


Abb. 4.7: Lokalisation und Dynamik der Deletionsvarianten von CENP-B und CENP-C. Zunächst wurde die Lokalisation von EGFP-CENP-B-DBD (A), EGFP-CENP-C(315-635) (D) und EGFP-CENP-C(635-943) (G) an den Centromeren mit Hilfe eines monoklonalen anti-CENP-A-Antikörpers (rot) im Immunfluoreszenz-Experiment nachgewiesen. (B), (E) und (H) zeigen in ausgewählten Aufnahmen aus den Bleichexperimenten schon qualitativ, dass sich die Deletionsvarianten alle mobil verhalten, was die quantitativen Auswertungen in (C), (F) und (I) ebenfalls zeigen. Der Fehler bei allen Messwerten betrug etwa 5-15 % (N=10). Größenbalken: 5 μ m.

Auch der isolierte mittlere und C-terminale Teil von CENP-C, CENP-C(315-635) und CENP-C(635-943), sind als EGFP-Fusionsproteine am Centromer hoch mobil (Abb. 4.7, F und I). EGFP-CENP-C(315-635) hat eine Halberholzeit $t_{1/2}$ von 10 s mit einer immobilen Fraktion von etwa 20 % (Abb. 4.7, F). EGFP-CENP-C(635-943) ist bereits nach etwa 5 s an den Centromeren zu 50 % ausgetauscht worden und nach 30 s nahezu vollständig (Abb. 4.7, I). Außerdem erkennt man in den mikroskopischen Aufnahmen der lebenden Zellen (Abb. 4.7, H) deutlich die starke homogene Verteilung dieses CENP-C-Fragments im Nukleoplasma zu der vergleichsweise schwach erkennbaren Lokalisation an den Centromeren selbst. Dies wird in den fixierten Zellen nicht so deutlich (Abb. 4.7, G) und ist ein weiterer Hinweis auf die hohe Mobilität von EGFP-CENP-C(635-943).

Die isolierten Domänen CENP-B-DBD, CENP-C(315-635) und CENP-C(635-943) der inneren Kinetochorproteine CENP-B und CENP-C sind somit notwendig und hinreichend für die richtige Lokalisierung dieser Proteine am Centromer-/Kinetochorbereich, sie sind aber nicht ausreichend für deren stabilen Einbau in diesen Multiproteinkomplex. Für die stabile Integration von CENP-B und CENP-C sind offensichtlich zusätzliche Proteinbereiche erforderlich.

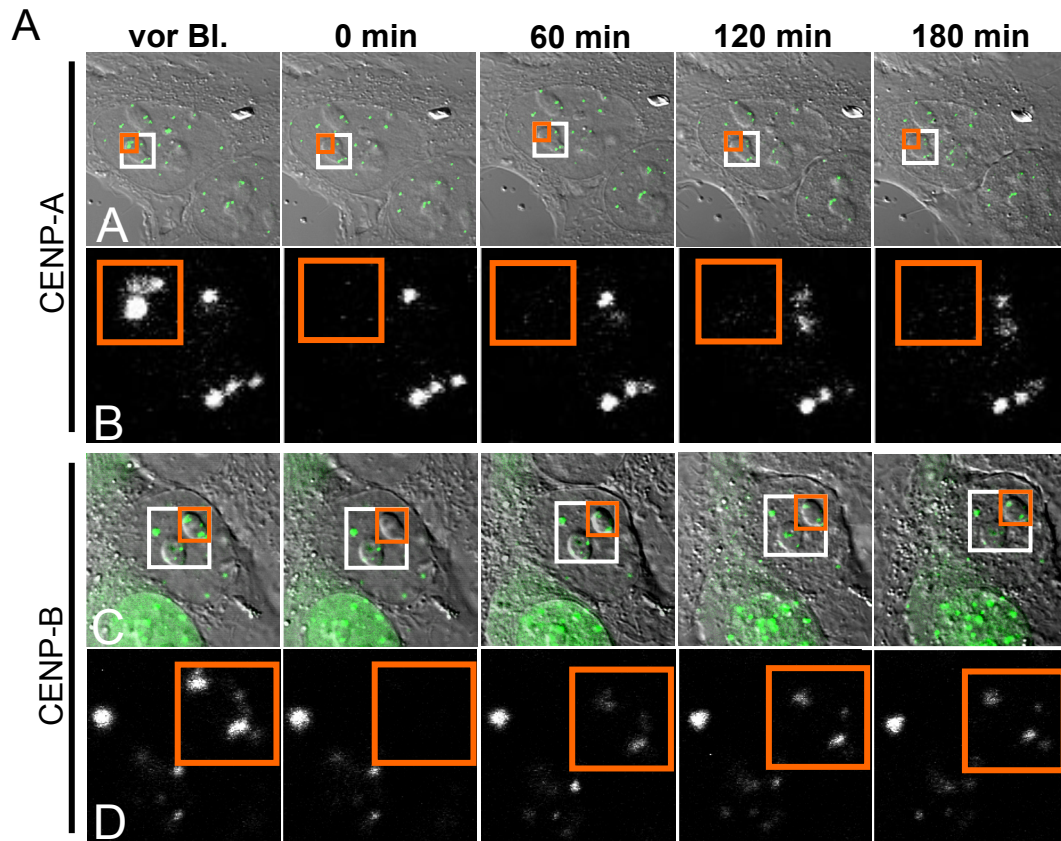
4.1.2.3 Langzeit-FRAP-Messungen von EGFP-CENP-A, -CENP-B, CENP-C, CENP-H und CENP-I

Nachdem sich in den ersten FRAP-Experimenten mit einem Beobachtungszeitraum von wenigen Minuten bereits andeutete, dass ein sehr langsamer Austausch der inneren Kinetochorproteine CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-H und CENP-I am Centromer-/Kinetochorbereich stattfindet, wurde in Langzeit-FRAP-Experimenten die Fluoreszenzerholung an den Centromeren über einen Zeitraum von drei Stunden beobachtet. Hierzu wurde nach dem Bleichen in einem Bereich, in dem etwa drei Centromere lagen, die Fluoreszenzerholung nach einer, zwei und drei Stunden gemessen. Wegen der stärkeren Bewegungen der ganzen Zelle in diesem längeren Beobachtungszeitraum wurden nun in Z-Richtung mehrere konfokale Ebenen der Zellkerne (Z-Stapel) aufgenommen. Centromere verändern in diesen Beobachtungszeiträumen ihre Position nicht (Weidtkamp-Peters *et al.*, 2005). Für die quantitative Auswertung wurden die korrespondierenden Ebenen in den Bildstapeln selektiert und die Fluoreszenzintensitäten in den gebleichten Bereichen vermessen. Abbildung 4.8, A zeigt beispielhaft konfokale Ebenen aus Messungen der

Proteine EGFP-CENP-A und -B in lebenden HEp-2-Zellen. Basierend auf der quantitativen Auswertung der Langzeit-FRAP-Experimente wurden mittels linearer Regression die theoretischen Fluoreszenzhalberholzeiten der EGFP-Proteine berechnet.

Neben der Histonvariante CENP-A zeigen auch die Proteine CENP-C, CENP-I und CENP-H eine sehr langsame Fluoreszenzerholung über den Zeitraum von 3 Stunden, die man bislang nur bei den regulären Histonproteinen H3 und H4 beobachtet hat (Kimura und Cook, 2001). Die Halberholzeit von CENP-A von 962 Minuten verdeutlicht den sehr langsamen Austausch des Proteins in den Nukleosomen des Centromerbereichs (Tabelle 4.1). Im Kontrast dazu zeigt CENP-B ein biphasisches Verhalten. Innerhalb der ersten 60 Minuten findet ein Austausch von 50 % der Gesamtfluoreszenz von EGFP-CENP-B statt. Danach erfolgt die Fluoreszenzerholung ähnlich langsam wie bei den anderen hier untersuchten Centromerproteinen. Dies deutet auf zwei unterschiedlich mobile Populationen von CENP-B hin: eine schnelle Population, die innerhalb der ersten Stunde nach dem Bleichimpuls ausgetauscht wird, und eine schnelle Population mit einer $t_{1/2}$ von 555 Minuten (Tabelle 4.1; Abb. 4.8, A, Reihe C und D). Die EGFP-markierten Proteine CENP-C und CENP-I zeigen eine Fluoreszenzerholung von etwa 15 % nach 3 Stunden (Abb. 4.8, B). Es erfolgt also auch bei diesen Proteinen ein sehr langsamer Austausch mit Halberholzeiten von $t_{1/2}=549$ min für EGFP-CENP-C und $t_{1/2}=512$ min für EGFP-CENP-I (Tabelle 4.1). Somit zeigen die Proteine EGFP-CENP-C, EGFP-CENP-I und eine Subpopulation EGFP-CENP-B ein sehr ähnliches kinetisches Verhalten im Centromer-/Kinetochorbereich. EGFP-CENP-H ist etwas mobiler: die Fluoreszenzerholung von EGFP-CENP-H erreicht nach 3 Stunden etwa 30 % (Abb. 4.8, B) mit einer Halberholzeit $t_{1/2}$ von 274 min (Tabelle 4.1).

Die Ergebnisse der verschiedenen FRAP-Experimente sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst. Abgesehen von der sehr hohen Mobilität des Proteins hMis12 in der Interphase zeigen alle anderen hier untersuchten Proteine des inneren Kinetochors nur eine sehr geringe Austauschrate am Centromer. Sie bilden offensichtlich einen sehr stabilen Multiproteinkomplex am Centromer-/Kinetochorbereich aus.



B

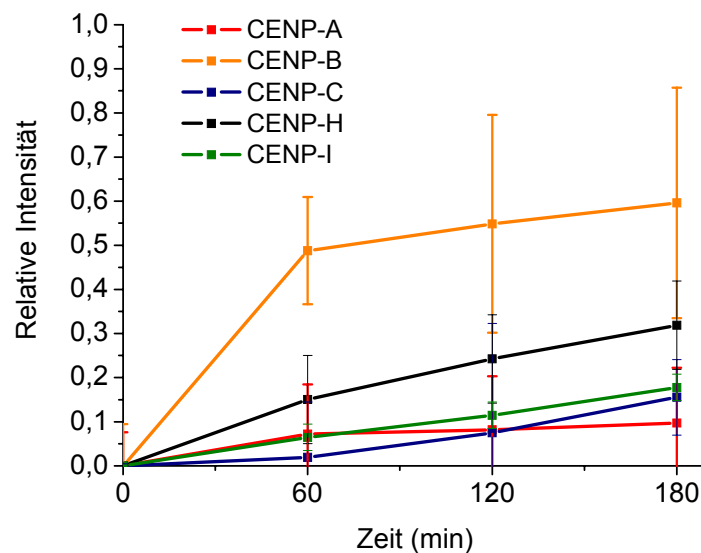


Abb. 4.8: Langzeit-FRAP-Messungen in EGFP-CENP-A-, EGFP-CENP-B-, EGFP-CENP-C, EGFP-CENP-H und EGFP-CENP-I-exprimierenden HEp-2-Zellen in der Interphase. A: EGFP-CENP-A und EGFP-CENP-B im Vergleich: Bildreihe A und Bildreihe C zeigen jeweils das Überlagerungsbild des Durchlicht- und GFP-Kanals des gesamten Zellkerns in einer konfokalen Ebene vor dem Bleichen (vor Bl.), sofort nach dem Bleichen (0 min.) und 60, 120 und 180 Minuten später. Reihe B und D zeigen den weiß-umrandeten Ausschnitt aus Reihe A und C mit dem gebleichten Bereich (oranges Quadrat). Die Zellen in A und C zeigen auch nach 180 min eine gesunde Morphologie. In beiden Zellen wird das EGFP-Fusionsprotein nur moderat exprimiert. B: Quantitative Auswertung der Langzeit-FRAP-Messungen für EGFP-CENP-A, EGFP-CENP-B, EGFP-CENP-C, EGFP-CENP-H und EGFP-CENP-I. Die Standardabweichung betrug bis zu 20 % (N=10).

	Interphase		Mitose	
	$t_{1/2}$	IF ⁽¹⁾ [%]	$t_{1/2}$	IF ⁽²⁾ [%]
CENP-A	(962 min)*	>90±10	n.m.	>90±5
CENP-B	(555 min) ⁽³⁾ *	40±25	4±0,3 s ⁽⁴⁾	60±5
CENP-B-DBD	40,0±3,0 s	0	50±3 s	45±5
CENP-C	(549 min)*	>80±10	n.m.	>95±10
CENP-C(315-635)	4,8±0,3 s	0	n.b.	n.b.
CENP-C(635-943)	4,0±0,3 s	0	n.b.	n.b.
CENP-I	(512 min)*	>80±10	n.m.	90±5
CENP-H	(274 min)*	70±10	n.m.	80±5
hMis12	4,8±0,3 s	0	n.m.	85±5

Tabelle 4.1: Übersicht über das dynamische Verhalten der EGFP-Fusionsproteine des inneren Kinetochors in der Interphase und der Mitose an den Centromeren. IF, immobile Fraktion; ⁽¹⁾ nach 180 Minuten; ⁽²⁾ nach 100 Sekunden; ⁽³⁾ $t_{1/2}$ der langsamen Subpopulation von EGFP-CENP-B; ⁽⁴⁾ $t_{1/2}$ der mobilen Subpopulation von EGFP-CENP-B, n.m., nicht messbar; n.b., nicht bestimmt; * da es sich um theoretisch berechnete Fluoreszenzhalberholzeiten handelt, wurde hier kein Fehler angegeben und die Werte wurden in Klammern gesetzt.

4.1.2.4 FCS-Messungen der inneren Kinetochorproteine

Nachdem das dynamische Verhalten der inneren Kinetochorproteine am Centromer-/Kinetochorbereich selbst untersucht wurde, sollte ergänzend auch die Dynamik der Proteine im Nukleoplasma humaner Zellen erfasst werden. Da die Proteinmenge und somit die Fluoreszenzintensität im Nukleoplasma sehr schwach ist, kann hier die FRAP-Technik nicht angewendet werden. Es wurde deshalb die sensitivere Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) eingesetzt. Dazu wird in einer Zelle, die die EGFP-Fusionsproteine gering exprimiert, der Laserstrahl im Nukleoplasma positioniert. Dort kann mit den üblichen Einstellungen für die Bildakquisition keine Fluoreszenz detektiert werden (Abb. 4.9, A und D). Die Zählratespur der FCS-Messung zeigt allerdings deutlich Fluoreszenzfluktuationen an (Abb. 4.9, B und E), die mit den weitaus empfindlicheren Detektionstechniken im FCS-Modus aufgenommen und dann autokorreliert werden können (Abb. 4.9, C). Somit kann auch der nukleoplasmatische Anteil eines EGFP-markierten Proteins hinsichtlich seines dynamischen Verhaltens charakterisiert werden.

In den FCS-Messungen konnten hochmobile freie Populationen von EGFP-CENP-A, -CENP-B, -CENP-I, -hMis12 und EYFP-CENP-H nachgewiesen werden. Die Ergebnisse waren

unabhängig von der Platzierung des Laserstrahls im Nukleoplasma. Lediglich EGFP-CENP-C konnte im Nukleoplasma nicht detektiert werden. Der Anteil des freien EGFP-CENP-C im Nukleoplasma war offenbar zu gering, um Fluoreszenzfluktuationen oberhalb der detektierten Hintergrundautofluoreszenz messen zu können. Die aus den FCS-Messungen resultierenden Autokorrelationskurven konnten anschließend an ein Modell für anomale dreidimensionale Diffusion angepasst werden (Bacia und Schwille, 2001). Das Modell lieferte die Diffusionskoeffizienten und Anomalieparameter für die einzelnen Fusionsproteine (Abb. 4.9, G). Um einen Vergleichswert zu haben, wurden auch der Diffusionskoeffizient und der Anomalieparameter eines EGFP-Proteins, das zusätzlich nur ein Kernlokalisierungssignal besitzt, ermittelt. Zusätzlich konnte mit Hilfe des Kehrwerts der Amplitude der Autokorrelationskurve auch die Konzentration der diffusiblen EGFP-Fusionsproteine im Nukleoplasma bestimmt werden. Die Konzentration der Proteine betrug im Durchschnitt 40-70 nM.

Die Diffusionskoeffizienten der EGFP-markierten inneren Kinetochorproteine liegen im Bereich von $0,9 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ bis $3,2 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ und repräsentieren somit eine Kombination aus freier Diffusion, Kollisionen, sowie transienten Interaktionen mit dem Chromatin, nukleären Strukturen und Proteinkomplexen (Tabelle 4.2, mittlere Spalte). Das Molekulargewicht der Proteine hingegen hat nur wenig Einfluss auf ihre Diffusionsgeschwindigkeit. Diese ist zur dritten Wurzel des Molekulargewichts proportional ($\tau_{\text{Diff}} \sim \sqrt[3]{m}$), d. h. erst eine achtfache Vergrößerung des Molekulargewichtes würde zu einer Halbierung der Diffusionsgeschwindigkeit führen (Lippincott-Schwartz *et al.*, 2001). Die Markierung eines Proteins mit EGFP, das ein Molekulargewicht von 27 kD hat, hat demnach nur einen geringen Einfluss auf die Diffusionsgeschwindigkeit des Fusionsproteins. So zeigen die FCS-Messungen der inneren Kinetochorproteine, dass das zweitgrößte Protein EGFP-CENP-I mit einem Molekulargewicht von 113 kD mit $D=2,20 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ den zweithöchsten Diffusionskoeffizienten hat, das viel kleinere EGFP-CENP-A ist dagegen mit $D=1,40 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ eindeutig langsamer.

Die ermittelten Diffusionskoeffizienten der EGFP-markierten inneren Kinetochorproteine sind für jedes Protein spezifisch und insgesamt deutlich kleiner als der Diffusionskoeffizient des nukleären EGFP, der mit $9,5 \pm 1,2 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ ermittelt wurde. Die unterschiedlichen Werte

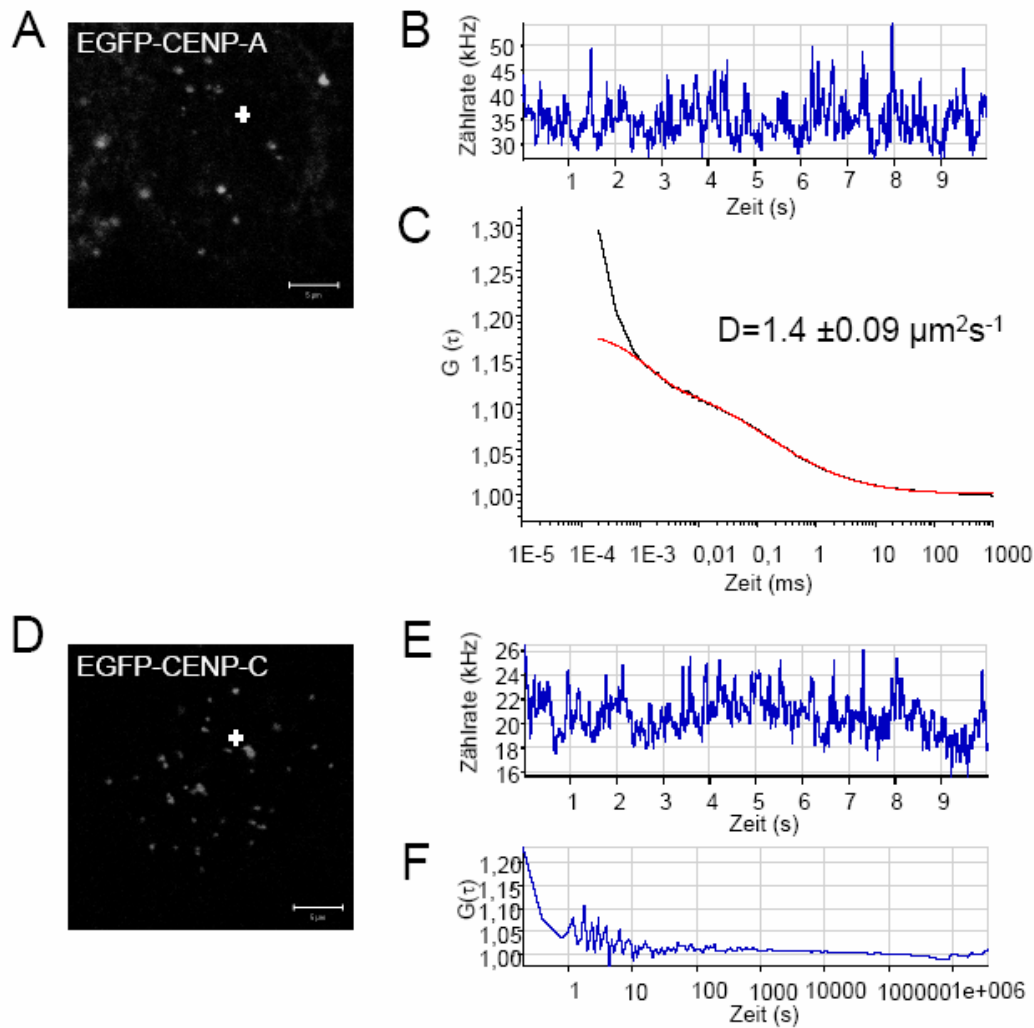


Abb. 4.9: FCS-Messungen in lebenden humanen Zellen. Die FCS-Messungen wurden außerhalb der Centromerbereiche im Nukleoplasma von Zellen durchgeführt, die die EGFP-Fusionsproteine nur gering exprimierten (A und D, weißes Kreuz). In jeder Einzelmessung wurden über einen Zeitraum von 10 Sekunden die Fluoreszenzfluktuationen im konfokalen Volumen detektiert (B und E). Aus den Autokorrelationen von mindestens 50 Einzelmessungen wurde eine gemittelte Autokorrelationskurve für jedes Protein ermittelt (C, schwarze Linie) und an ein theoretisches Diffusionsmodell (hier: dreidimensionale anomale Diffusion) angepaßt (C, rote Linie). So konnte dann der Diffusionskoeffizient D und der Anomalieparameter α ermittelt werden. Für das Protein EGFP-CENP-C konnte aus den Fluoreszenzfluktuationen der Einzelmessungen keine Autokorrelationen ermittelt werden (F), da offenbar zu wenig freies Protein vorhanden war (E: mittlere Zählrate: 20 kHz; mittlere Zählrate Hintergrundfluoreszenz: 10 kHz, nicht gezeigt). Größenbalken: 5 μm .

der einzelnen Diffusionskoeffizienten sind ein Hinweis darauf, dass die einzelnen Proteine des inneren Kinetochors außerhalb dieser nukleären Struktur nicht in präassemblierten Komplexen vorliegen. In diesem Fall wären die Diffusionskoeffizienten identisch (Baudendistel *et al.*, 2005). Der Zusammenbau des Komplexes erfolgt demnach erst am Centromer-/Kinetochorbereich.

EGFP-Protein	Diffusionskoeffizient D [$\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$]	Anomalie-Parameter α
CENP-A	1,40 \pm 0,09	0,57
CENP-B	0,92 \pm 0,22	0,46
CENP-B-DBD	1,65 \pm 0,13	0,53
CENP-C	n.a.	n.a.
CENP-C(315-635)	1,08 \pm 0,05	0,65
CENP-C(635-943)	1,54 \pm 0,21	0,62
CENP-I	2,20 \pm 0,10	0,51
CENP-H	3,19 \pm 0,18	0,62
hMis12	1,70 \pm 0,46	0,63
GFP	9,5 \pm 1,20	0,75

Tabelle 4.2: Übersicht über das dynamische Verhalten der EGFP-Fusionsproteine des inneren Kinetochors im Nukleoplasma in der Interphase.

Neben dem Diffusionskoeffizienten D gibt auch der Anomalieparameter α Auskunft über das dynamische Verhalten der Proteine (Tabelle 4.2, rechte Spalte): befindet sich ein Fluoreszenzfarbstoffmolekül in einer wässrigen Lösung, kann es frei diffundieren, es liegt keine Anomalie in der Diffusion dieses Moleküls vor. Der Anomalieparameter einer solchen Messung im Modell für dreidimensionale anomale Diffusion nimmt hier den Wert 1 an. Im Nukleoplasma einer lebenden Zelle hingegen ist die Diffusion der Proteine durch das Chromatin, nukleäre Strukturen und Proteinkomplexe des Nukleoplasmas eingeschränkt, der Anomalieparameter wird kleiner als 1; auch dann, wenn das Protein, wie z. B. EGFP, keine natürlichen Wechselwirkungspartner hat (Wachsmuth *et al.*, 2001). Im Nukleoplasma einer eukaryotischen Zelle kann der Anomalieparameter für EGFP den theoretischen Wert 0,75 annehmen (Banks und Fradin, 2005).

Die Anomalieparameter der inneren Kinetochorproteine liegen zwischen 0,65 und 0,46 (Tabelle 4.2, rechte Spalte), wobei das Protein CENP-B mit $\alpha=0,46$ den niedrigsten Wert und damit den höchsten Grad an anomaler Diffusion zeigt. Die DNA-bindende Domäne dieses Proteins könnte die Ursache für zusätzliche transiente Wechselwirkungen mit der DNA sein, die die anderen Proteine des inneren Kinetochors nicht eingehen können und somit ihre Diffusion weniger stark eingeschränkt ist.

4.2 Das dynamische Verhalten der nukleären Isoformen des PML-Proteins, PML-I bis PML-VI

Dem Protein PML als Strukturkomponente der PML-Kernkörperchen werden viele Funktionen in Zusammenhang mit den grundlegenden Abläufen im Zellkern wie Transkription, Replikation, DNA-Reparatur und Zellzyklussteuerung zugeschrieben. Dabei fand erst in jüngster Zeit bei Untersuchungen zur Funktion des PML-Proteins und der PML-Kernkörperchen Beachtung, dass es verschiedene Isoformen des PML-Proteins gibt, die auf alternatives Spleißen der neun Exone des *PML*-Gens zurückzuführen sind (Jensen *et al.*, 2001; Beech *et al.*, 2005; Condemine *et al.*, 2006) und möglicherweise ganz unterschiedliche Funktionen in der Zelle wahrnehmen. Sechs der sieben PML-Isoformen, (I– VI), haben eine nukleäre Lokalisation und können an den PML-Kernkörperchen detektiert werden. Das dynamische Verhalten dieser nukleären PML-Isoformen wurde ebenfalls mit Hilfe von EGFP-Fusionsproteinen und der Anwendung der Techniken FCS und FRAP untersucht.

4.2.1 Charakterisierung der EGFP-Fusionsproteine EGFP-PML-I bis EGFP-PML-VI nach der Expressionslänge

Zur Bestimmung der Expressionlänge der EGFP-Fusionsproteine von PML-I bis PML-VI wurden U2OS-Zellen transient transfiziert. Das Protein p53 wird in dieser Zelllinie stärker exprimiert als in Primärzellen, ist aber nicht mutiert (Floerenes *et al.*, 1994). Diese Zelllinie wird eingesetzt, weil p53 als wichtiger Tumorsuppressor vielfältig mit PML interagiert und seine Funktion in U2OS-Zellen intakt ist. Nach 24 Stunden wurden von diesen Zellen Zelllysate hergestellt, im Western Blot wurde dann ihre Expressionslänge überprüft.

Abbildung 4.10 zeigt, dass in den Lysaten die EGFP-Fusionsproteine der PML-Isoformen sowohl vom GFP-Antikörper als auch vom Peptidantikörper gegen PML erkannt wurden. Da keine zweite Bande etwa 27 kD unterhalb der Bande der jeweiligen EGFP-markierten PML-Isoform erscheint, konnte durch den Peptidantikörper gegen PML (Bahn 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16) das endogene PML-Protein innerhalb der hier gewählten Expositionszeiten offensichtlich nicht detektiert werden. In der Gesamtpopulation der Zellen eines Lysates scheint also die Menge des exogenen EGFP-PML-Proteins im Verhältnis zum endogenen PML größer zu

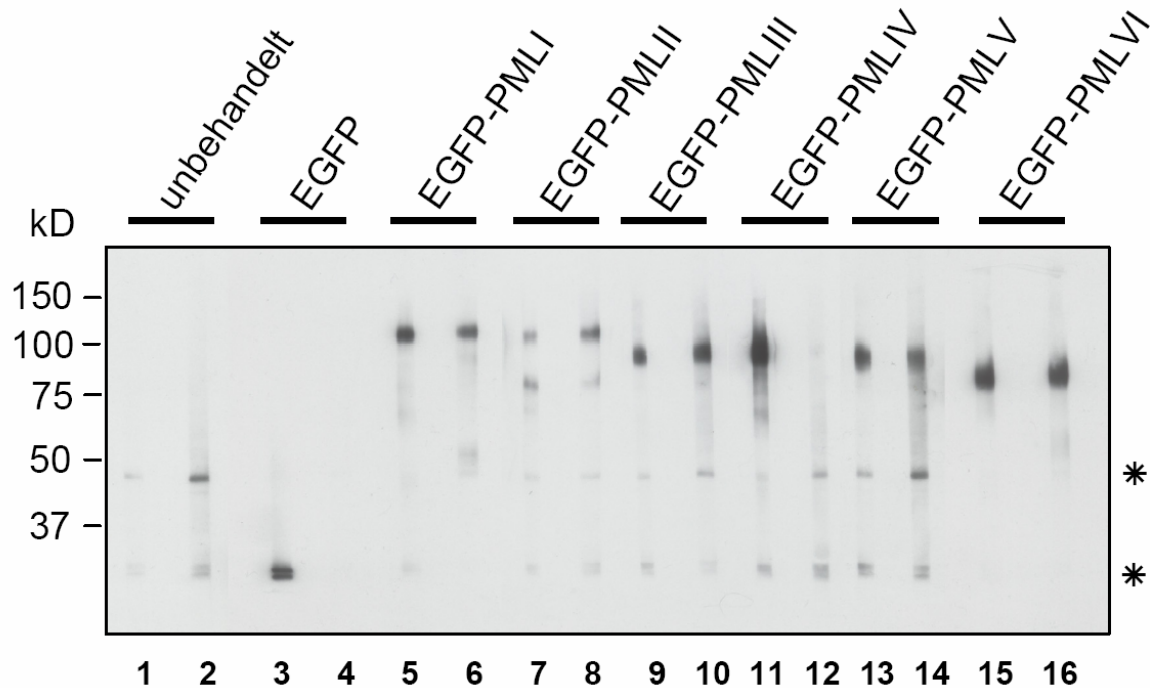


Abb. 4.10: Western Blot der transient in U2OS-Zellen exprimierten EGFP-Fusionsproteine der PML-Isoformen I-VI. Die Fusionsproteine wurden mit einem Antikörper gegen GFP in der Verdünnung 1:50 (Bahn 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15), bzw. mit einem Peptidantikörper gegen ein Peptid (AS 460-497) des PML-Proteins in der Verdünnung 1:500 (Bahn 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16) detektiert. * markiert zwei unspezifische Banden, die der 2. Antikörper in Abhängigkeit von der Expositionszeit zeigt. Die untere dieser beiden Banden läuft auf der Höhe des EGFP-Proteins bei etwa 27kD. Proteingrößen: EGFP 27kD, EGFP-PML-I 124kD, EGFP-PML-II 118kD, EGFP-PML-III 98kD, EGFP-PML-IV 97kD, EGFP-PML-V 94kD, EGFP-PML-VI 89kD.

sein, was den optischen Eindruck einer sehr hohen Transfektionseffizienz und z.T. starken Überexpression der EGFP-Fusionsproteine vor der Ernte der transfizierten Zellen bestätigt.

Sowohl der Anti-GFP-Antikörper (Bahn 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15) als auch der Antikörper gegen ein N-terminales Peptid des PML-Proteins erkennen die EGFP-PML-Fusionsproteine in den Lysaten. Lediglich EGFP-PML-IV wird vom Peptidantikörper gegen PML nur sehr schwach detektiert (Abb. 4.10, Bahn 12), vom GFP-Antikörper hingegen sehr gut (Abb. 4.10, Bahn 11), was eher auf eine unzureichende Inkubation mit dem Antikörper hindeutet als darauf, dass das Protein nur so schwach exprimiert wurde. Alle Fusionsproteine werden in den erwarteten Proteingrößen in den U2OS-Zellen exprimiert.

4.2.2 Charakterisierung der EGFP-Fusionsproteine EGFP-PML-I bis EGFP-PML-VI nach ihrer Lokalisation im Zellkern

In indirekten Immunfluoreszenzexperimenten wurde zusätzlich zur Größe der exogen eingebrachten EGFP-PML-Isoformen ihre Lokalisation im Zellkern von U2OS-Zellen im Bezug zu den PML-Kernkörperchen untersucht.

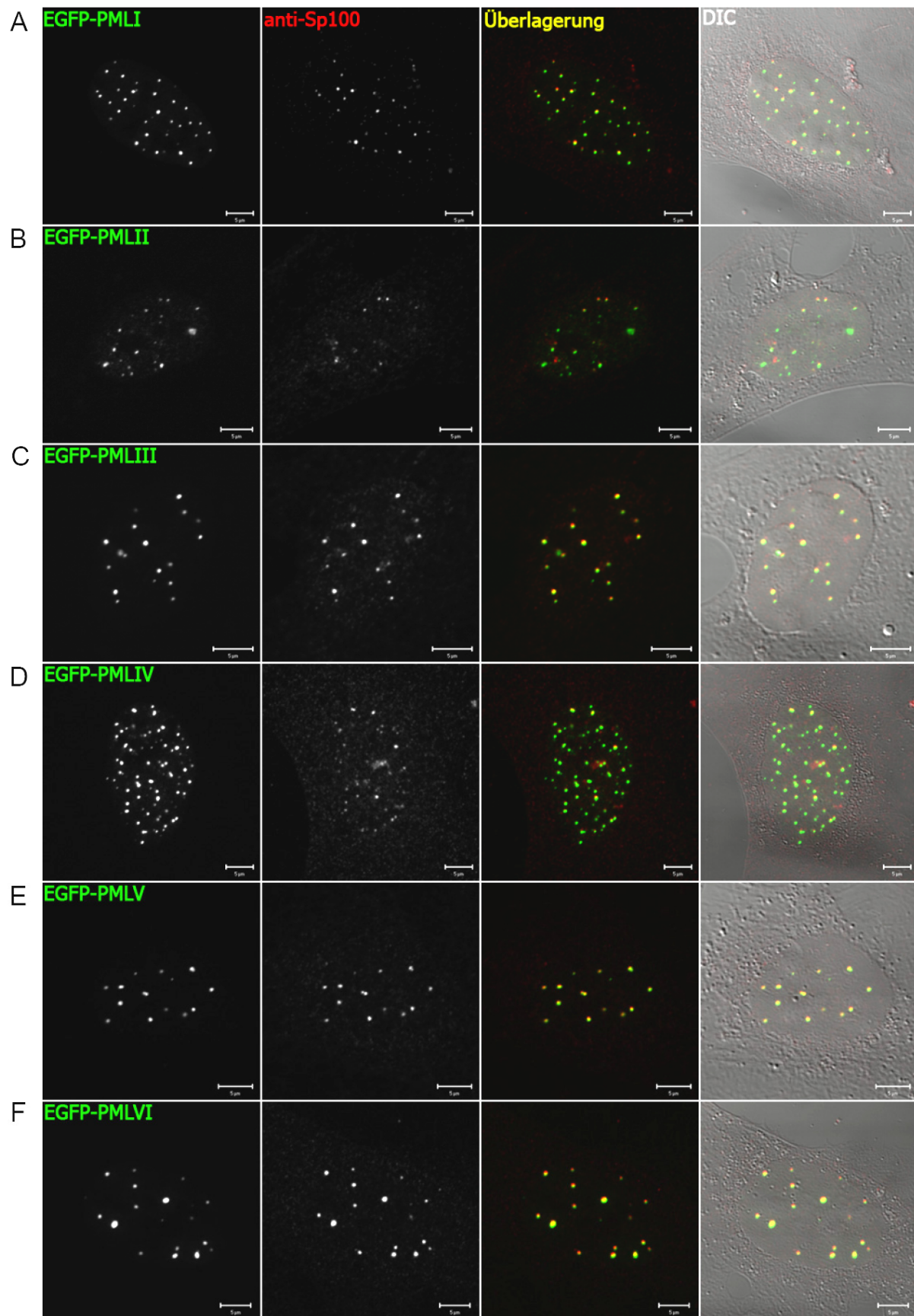


Abb. 4.11: Lokalisation der EGFP-PML-Isoformen in U2OS-Zellen. Transient mit den einzelnen EGFP-PML-Isoformen (grün) transfizierte U2OS-Zellen wurden mit einem Antikörper gegen das Protein Sp100 in der Verdünnung 1:1000 gegengefärbt (rot). Größenbalken: 5 μm.

Um die endogenen PML-Kernkörperchen anzufärben, wurde ein Antikörper gegen das Protein Sp100, die zweite Strukturkomponente der PML-Kernkörperchen, eingesetzt. Alle EGFP-PML-Isoformen zeigen bei moderater Expression eine punktförmige Verteilung im Zellkern und kolokalisieren wenigstens z.T. mit dem endogenen Protein Sp100 in PML-Kernkörperchen (Abb. 4.11, Überlagerungen). Es werden aber auch leichte Unterschiede zwischen der Verteilung der PML-Isoformen im Zellkern deutlich: nahezu vollständige Kolokalisation mit dem endogenen Protein Sp100 in relativ wenigen, größeren PML-Kernkörperchen zeigen die EGFP-markierten Isoformen PML-III, -V und -VI (Abb. 4.11; C, E und F). Die Isoformen PML-I und -IV bilden eine größere Anzahl kleinerer PML-Kernkörperchen, von denen viele keine Kolokalisation mit dem Protein Sp100 in den endogenen PML-Kernkörperchen zeigen (Abb. 4.11; A und D). Die Isoform EGFP-PML-II zeigt das geringste Maß an Kolokalisation mit Sp100 und bildet eher diffusere Akkumulationen des Fusionsproteins (Abb. 4.11; B). Bei Überexpression lokalisiert EGFP-PML-II zusätzlich in flachen, unförmigen Aggregaten an der Zellkernhülle (hier nicht gezeigt).

Diese leichten Unterschiede in der Lokalisation der verschiedenen nukleären PML-Isoformen in den Immunfluoreszenzexperimenten lassen unterschiedliche Aufgaben der Isoformen beim Aufbau der Struktur der PML-Kernkörperchen und ihrer Funktion vermuten. PML-III, -V und VI könnten eine stärkere strukturelle Funktion haben als die Isoformen PML-I, -II und IV, die als exogen eingebrachte EGFP-Fusionsproteine zusammen mit allen endogen vorhandenen PML-Isoformen nur kleinere PML-Kernkörperchen ausbilden.

4.2.3 Mobilität der EGFP-Fusionsproteine der PML-Isoformen PML-I bis -VI an den PML-Kernkörperchen und im Nukleoplasma

In lebenden U2OS-Zellen sollte nun das dynamische Verhalten der unterschiedlichen PML-Isoformen an den PML-Kernkörperchen und im Nukleoplasma in FRAP- und FCS-Experimenten untersucht werden. Bislang wurde in FRAP-Experimenten nur die Dynamik von nicht näher spezifizierten fluoreszenzmarkierten PML-Isoformen an den PML-Kernkörperchen selbst untersucht (Wiesmeijer *et al.*, 2002; Boisvert *et al.*, 2001).

4.2.3.1 FRAP-Experimente in EGFP-PML-I bis –VI-exprimierenden U2OS-Zellen

Die EGFP-Fusionsproteine der sechs PML-Isoformen wurden transient in U2OS-Zellen transfiziert. Nach 16 bis 20 Stunden wurden Zellen mit moderater Expression in den Lebendzellversuchen analysiert. Dazu wurde die EGFP-Fluoreszenz in zwei bis drei der PML-Kernkörperchen mit einem starken Laserimpuls zerstört und die Fluoreszenzerholung hier über einen Zeitraum von 20 Minuten beobachtet. Das Zeitintervall für die Bildakquise betrug 5 Sekunden (Abb. 4.12). Die quantitative Auswertung zeigt, dass die unterschiedlichen PML-Isoformen an den PML-Kernkörperchen mit unterschiedlicher Dynamik ausgetauscht werden. Während das Protein EGFP-PML-I (Abb. 4.12, A) im Beobachtungszeitraum von 20 Minuten vollständig ausgetauscht wird, zeigt EGFP-PML-V im gleichen Zeitraum nur eine Fluoreszenzerholung von etwa 30 Prozent (Abb. 4.12, E). Sehr deutlich werden die Unterschiede in Abb. 4.13, B, in der die FRAP-Kurven der einzelnen EGFP-markierten PML-Isoformen zusammengefasst dargestellt sind.

EGFP-PML-I ist die Isoform mit der höchsten Austauschrate. Sie hat nach 20 Minuten wieder die gleiche Fluoreszenzintensität an den PML-Kernkörperchen erreicht wie vor dem Bleichen. EGFP-PML-II, -III, und -IV haben eine sehr ähnliche Austauschkinetik an den PML-Kernkörperchen mit einer Fluoreszenzhalberholzeit von 380-400 s (Abb. 4.13, C) und einem Anteil von noch nicht ausgetauschtem Protein von 20 % nach 20 Minuten. EGFP-PML-VI zeigt in den ersten 10 Minuten eine ähnliche Kinetik wie EGFP-PML-II, -III, und -IV, nach 20 Minuten erreicht die relative Fluoreszenzerholung aber nur 70 % der Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen. Deutlich anders verhält sich EGFP-PML-V, das nach 20 Minuten nur zu 30 % an den PML-Kernkörperchen ausgetauscht wird. Die Isoform PML-V könnte somit eine strukturelle Funktion unter den verschiedenen PML-Isoformen wahrnehmen, die für den Aufbau und strukturellen Fortbestand der PML-Kernkörperchen wichtig ist.

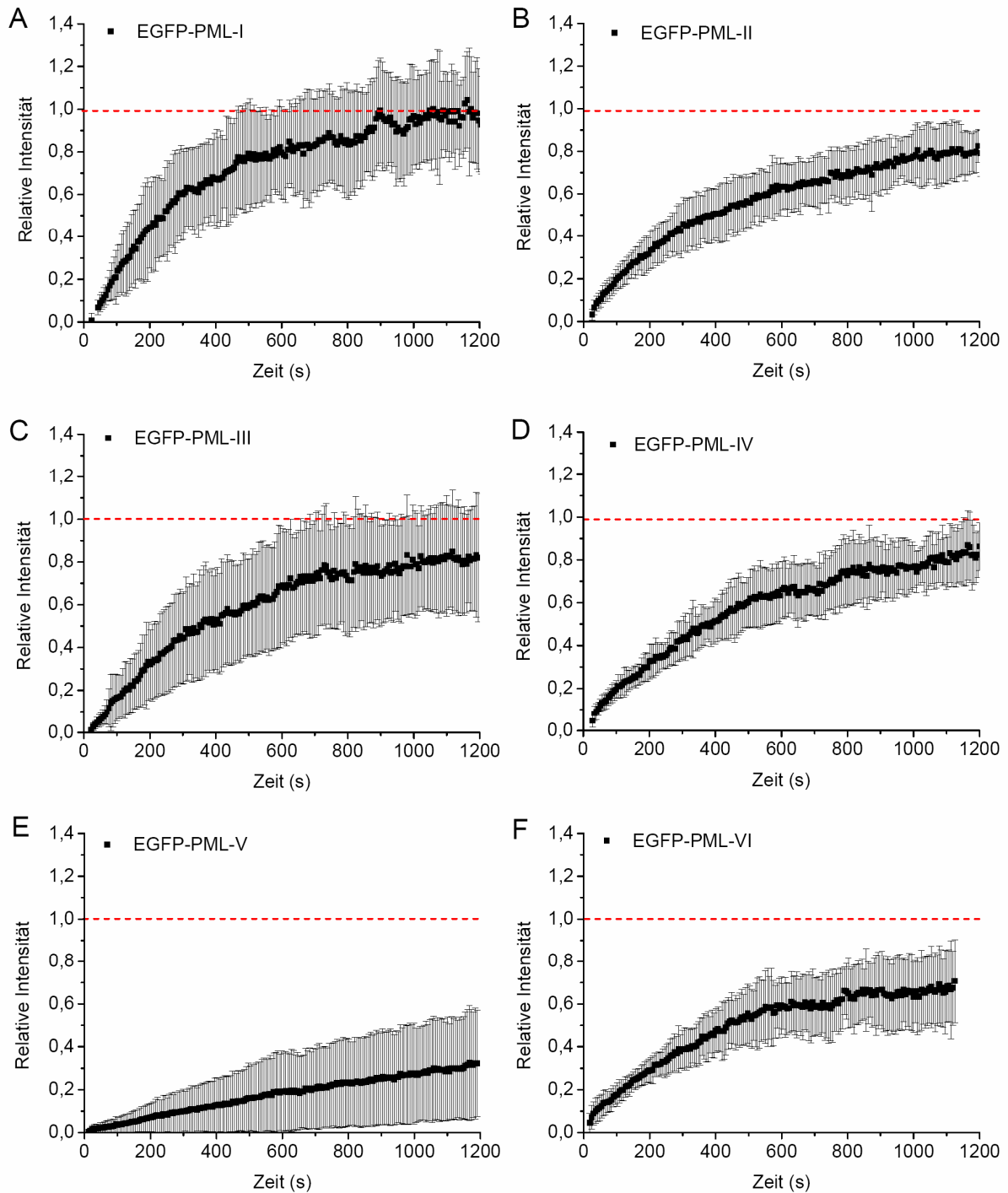


Abb. 4.12: Quantitative Auswertung der FRAP-Messungen der Fusionsproteine EGFP-PML-I bis -VI in U2OS-Zellen. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzerholung und Standardabweichung nach dem Bleichen an den PML-Kernkörperchen. Pro PML-Isoform wurden etwa 15 Einzelmessungen durchgeführt, bei denen 2 bis 3 PML-Kernkörperchen in einem Zellkern gebleicht wurden. Die unterbrochene rote Linie markiert den Wert 1 der relativen Fluoreszenzintensität, der einer kompletten Fluoreszenzerholung im gebleichten Bereich entspricht. Dieser Wert wird im Beobachtungszeitraum von 20 Minuten nur vom Fusionsprotein EGFP-PML-I erreicht (A).

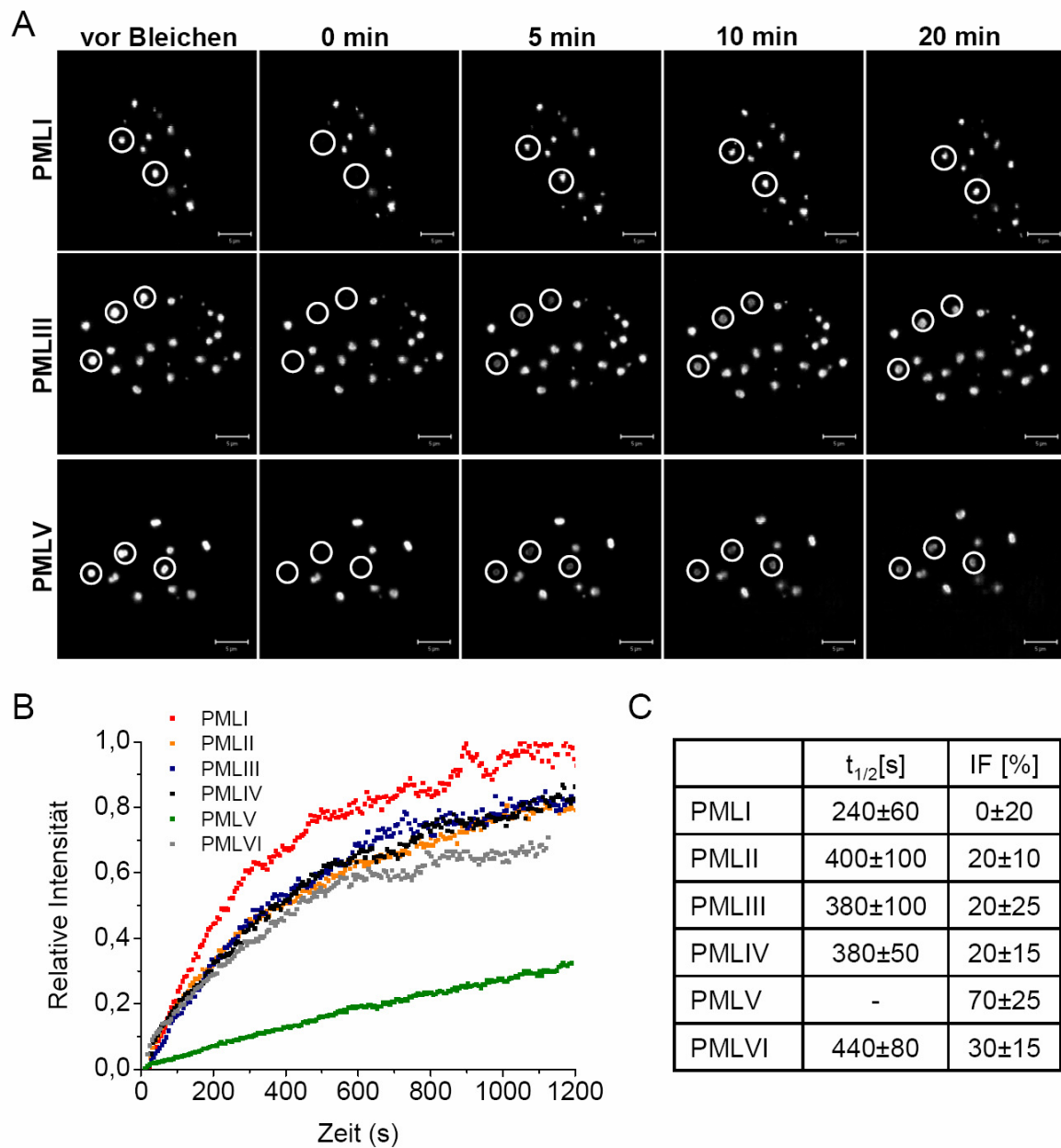


Abb. 4.13: Fluoreszenzerholung der verschiedenen PML-Isoformen an den PML-Kernkörperchen im Vergleich. (A) Ausgewählte Bilder aus FRAP-Experimenten der drei Isoformen EGFP-PML-I, -PML-III und -PML-V vor und nach dem Bleichen. Während PML-I bereits nach 5 Minuten (300 Sekunden) an den PML-Kernkörperchen fast komplett ausgetauscht wurde, findet bei PML-III und PML-V nur eine langsame Fluoreszenzerholung statt. (B) Zusammenfassung der quantitativen Auswertungen der FRAP-Experimente zum besseren Vergleich der PML-Isoformen. (C) Tabelle über die aus den quantitativen Auswertungen resultierenden Fluoreszenzhalberholzeiten $t_{1/2}$ in s und den Prozentsatz der im Beobachtungszeitraum immobilen Fraktion (IF) der jeweiligen PML-Isoform.

4.2.3.1 FCS-Experimente in EGFP-PML-I bis -VI-exprimierenden U2OS-Zellen

Ergänzend zu den FRAP-Experimenten an den PML-Kernkörperchen wurden (nach der gleichen Vorgehensweise wie bei den Proteinen des inneren Kinetochors) FCS-Messungen mit den EGFP-markierten PML-Isoformen im Nukleoplasma von lebenden U2OS-Zellen durchgeführt.

Abb. 4.14, B zeigt beispielhaft eine lebende Zelle mit PML-Kernkörperchen und den im differentiellen Interferenzkontrast (DIC) deutlich erkennbaren Nukleoli. Das weiße Kreuz markiert eine Position im Nukleoplasma außerhalb dieser Strukturen, an der eine FCS-Messung durchgeführt wurde. Für alle EGFP-markierten PML-Isoformen konnten mit den FCS-Messungen Fluoreszenzfluktuationen im Nukleoplasma detektiert werden, die auch autokorreliert werden konnten. Auch hier konnten die Autokorrelationskurven erfolgreich an das theoretische Modell der anomalen dreidimensionalen Diffusion angepasst werden. Abb. 4.14, A zeigt exemplarisch die Autokorrelationskurve von EGFP-PML-III (schwarze Linie, großes Diagramm) und die angepasste Kurve des Modells für anomale dreidimensionale Diffusion (unterbrochene rote Linie). Zusätzlich zeigt das kleine Diagramm den „Residuals plot“, der die (geringen) Abweichungen der angepassten von der gemessenen Kurve angibt.

Um die Autokorrelationskurven der verschiedenen PML-Isoformen besser vergleichen zu können, wurden sie normiert und in einem Diagramm zusammengefasst dargestellt (Abb. 4.14, C). Wie auch bei den EGFP-Fusionsproteinen des inneren Kinetochors sind die Diffusionskoeffizienten der PML-Isoformen mit $1,02$ bis $2,79 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ deutlich kleiner als der des nukleären GFP. Die Größe der verschiedenen EGFP-markierten PML-Isoformen liegt zwischen 124 kD für EGFP-PML-I und 89 kD für EGFP-PML-VI. Diese Größenunterschiede dürften nur einen geringen Einfluß auf die Diffusionskoeffizienten der PML-Isoformen haben (s. 4.1.2.4 FCS-Messungen der inneren Kinetochorproteine). Dies wird durch die Beobachtung unterstützt, dass das größte Protein, EGFP-PML-I, mit $1,85 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ nur den zweitgrößten Diffusionskoeffizienten hat. Diese PML-Isoform zeigte auch in den FRAP-Experimenten an den PML-Kernkörperchen die größte Mobilität mit einer Halberholzeit von 240 Sekunden und einer vollständigen Fluoreszenzerholung im Beobachtungszeitraum von 20 Minuten (Abb. 4.13, C). Allerdings scheint die Diffusion dieser PML-Isoform durch Wechselwirkungen und Interaktionen stark eingeschränkt zu sein, da der Anomalieparameter α nur $0,47$ beträgt. Den mit Abstand größten Diffusionskoeffizienten hat EGFP-PML-V mit $2,79 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. Dieses Protein zeigt an den PML-Kernkörperchen den geringsten Austausch.

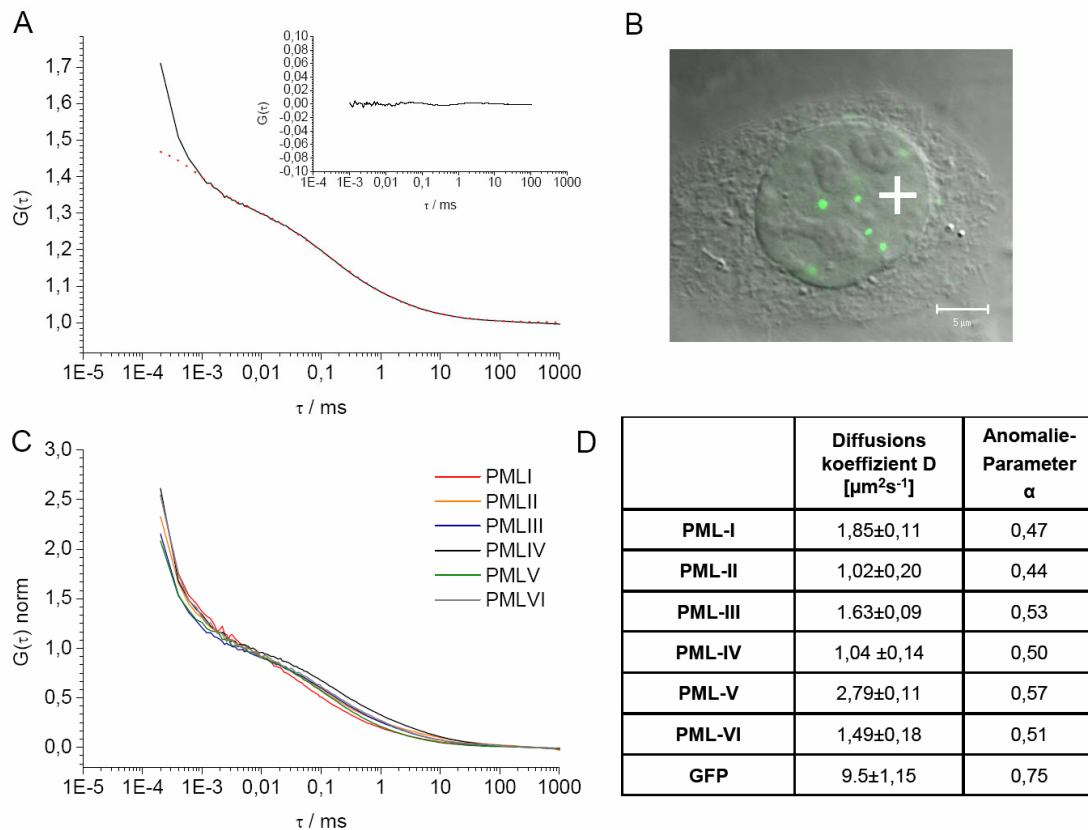


Abb. 4.14: FCS-Messungen der EGFP-markierten PML-Isoformen im Nukleoplasma lebender U2OS-Zellen. (A) Beispiel für eine Autokorrelationskurve, hier von EGFP-PML-III (schwarze Linie) angepasst mit dem theoretischen Diffusionsmodell für anomale dreidimensionale Diffusion (unterbrochene rote Linie) und „Residuals plot“; (B) Lebende Zelle mit PML-Kernkörperchen und Nukleoli im Nukleoplasma, das weiße Kreuz markiert eine Stelle, an der eine FCS-Messung durchgeführt wurde. (C) Normierte Autokorrelationskurven der EGFP-markierten PML-Isoformen. Die Kurven von EGFP-PML-I und -V fallen bei 0,6 ms deutlich schneller ab als die anderen Kurven, die Kurve von EGFP-PML-IV fällt insgesamt langsamer ab. (D) Tabelle der Diffusionskoeffizienten und Anomalieparameter der PML-Isoformen. Größenbalken: 5 μm .

Es erreicht innerhalb des Beobachtungszeitraumes nur eine Fluoreszenzerholung von 30 % (Abb. 4.13, C). Dieser scheinbare Widerspruch lässt sich auflösen, wenn man davon ausgeht, dass EGFP-PML-V im Nukleoplasma weniger Wechselwirkungs- und Interaktionspartner hat als die anderen PML-Isoformen und tatsächlich seine Hauptfunktion beim Aufbau und der Aufrechterhaltung der Struktur der PML-Kernkörperchen wahrnimmt. Der unter den PML-Isoformen höchste Anomalieparameter von 0,57 unterstützt diese Annahme. Die Diffusionskoeffizienten der anderen PML-Isoformen liegen zwischen 1,02 und 1,63 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$. Die Diffusion dieser PML-Isoformen im Nukleoplasma ist also offenbar noch stärker durch Wechselwirkungen behindert, wofür auch die Anomalieparameter zwischen 0,44 und 0,53 sprechen.

Die FCS-Messungen zeigen deutlich, dass auch im Nukleoplasma Unterschiede im dynamischen Verhalten zwischen den verschiedenen EGFP-markierten PML-Isoformen bestehen.

4.3 Dynamik von PML-Kernkörperchen bei der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur

Die vorangegangenen Arbeiten beschrieben die Kernkörperchen-Assemblierungskinetiken von sechs PML-Proteinisoformen sowie deren Diffusionseigenschaften im umgebenden Nukleoplasma in proliferierenden Zellkulturzellen. Es wird angenommen, dass PML-Kernkörperchen in die biochemischen Zellkernprozesse Replikation, Transkription, proteasomen-vermittelte Proteolyse und DNA-Reparatur durch direkte räumliche Assoziation mit solchen fokalen Orten involviert sind (Grande *et al.*, 1996; Kießlich *et al.*, 2002; Lallemand-Breitenbach *et al.*, 2001; Rockel *et al.*, 2006). Um diese Hypothese zu überprüfen, sollte die Dynamik von PML an Orten aktiver biochemischer Reaktionen untersucht werden. Da Replikation, Transkription und proteasomen-vermittelte Proteolyse normale Vorgänge in proliferierenden Zellen darstellen, spiegeln diese die konstitutive Verteilung und Dynamik von PML wider. Daher wurde für die Untersuchung der Dynamik von PML an Orten aktiver biochemischer Reaktion das experimentelle System der induzierbaren DNA-Strangbrüche (DSBs) durch ionisierende Strahlung ausgewählt. Orte aktiver DSB-Reparatur können immunfluoreszenz-mikroskopisch spezifisch durch Antikörper gegen die phosphorylierte Form der Histonvariante H2AX (γ -H2AX) visualisiert werden (Rogakou *et al.*, 1999). Einige Berichte in der Literatur hatten bereits eine räumliche Assoziation zwischen γ -H2AX-Foci und PML-Kernkörperchen beschrieben (Bischof *et al.*, 2001; Carbone *et al.*, 2002; Seker *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003; Boe *et al.*, 2006).

4.3.1 Lokalisation von γ -H2AX-Foci und PML-Kernkörperchen nach ionisierender Bestrahlung

Zunächst sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß sich Zahl, Form und relative Position von PML-Kernkörperchen und γ -H2AX-Foci während der DSB-Reparatur ändern. Durch unterschiedlich hohe Dosen ionisierender Bestrahlung zwischen 0 und 15 Gray wurden in U2OS-Zellen DSBs induziert. Fokale DSB-Reparaturorte und PML-Kernkörperchen wurden dann jeweils mit spezifischen Antikörpern über einen Zeitraum von 24 Stunden analysiert.

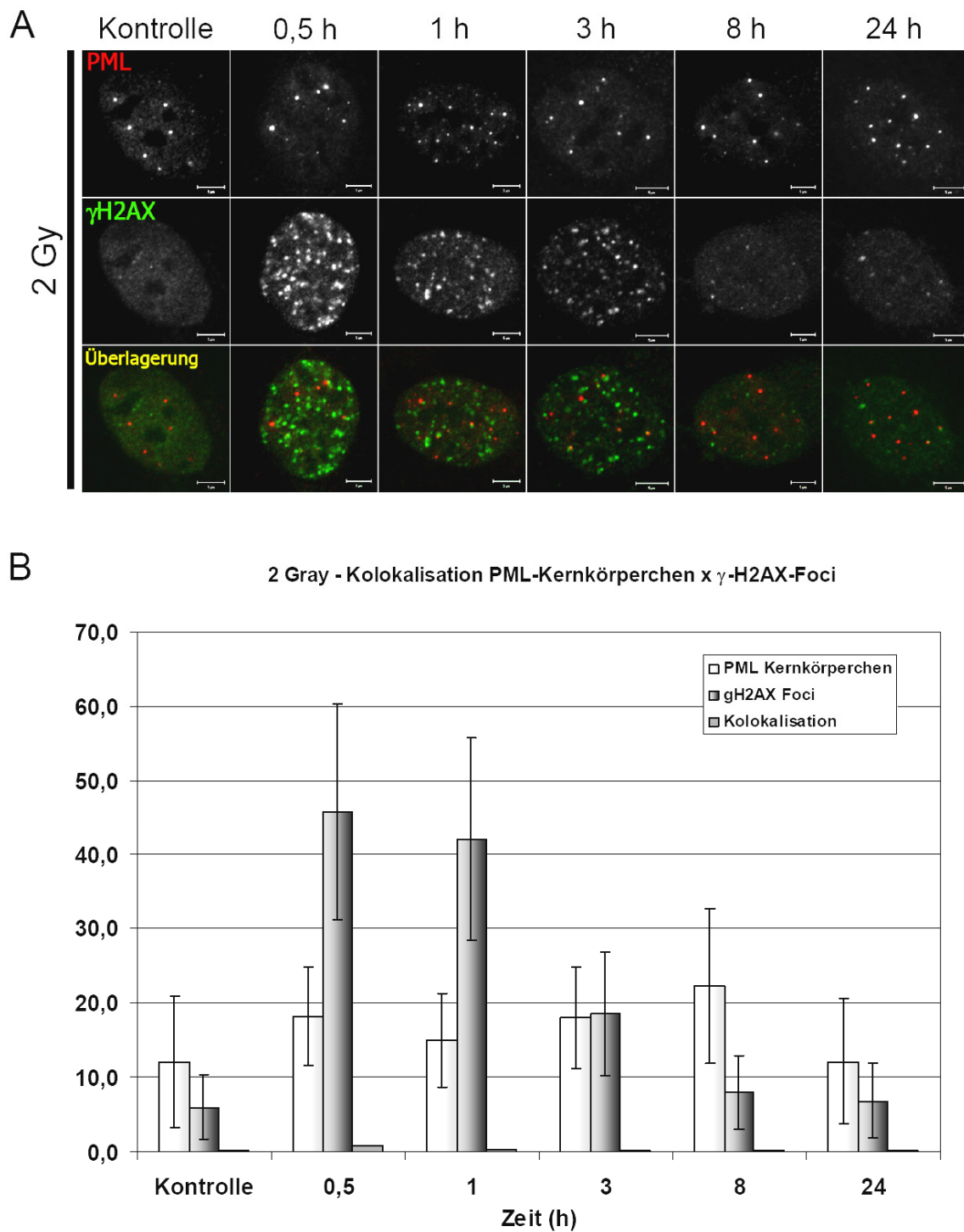


Abb. 4.15: Kolokalisation von γ -H2AX-Foci und PML-Kernkörperchen nach Bestrahlung mit 2 Gray in U2OS-Zellen. (A) Ausgewählte Zellkerne einer unbehandelten Zelle, sowie von Zellen zu den fünf verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung, in denen die γ -H2AX-Foci mit einem monoklonalen Mausantikörper (grün) und die PML-Kernkörperchen mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper (rot) angefärbt wurden. (B) Quantitative Auswertung der Anzahl der γ -H2AX-Foci, der PML-Kernkörperchen und der Anzahl der Kolokalisationen zwischen beiden Strukturen pro Zelle. Pro Zeitpunkt wurden 50 Zellen ausgewertet. Größenbalken: 5 μ m.

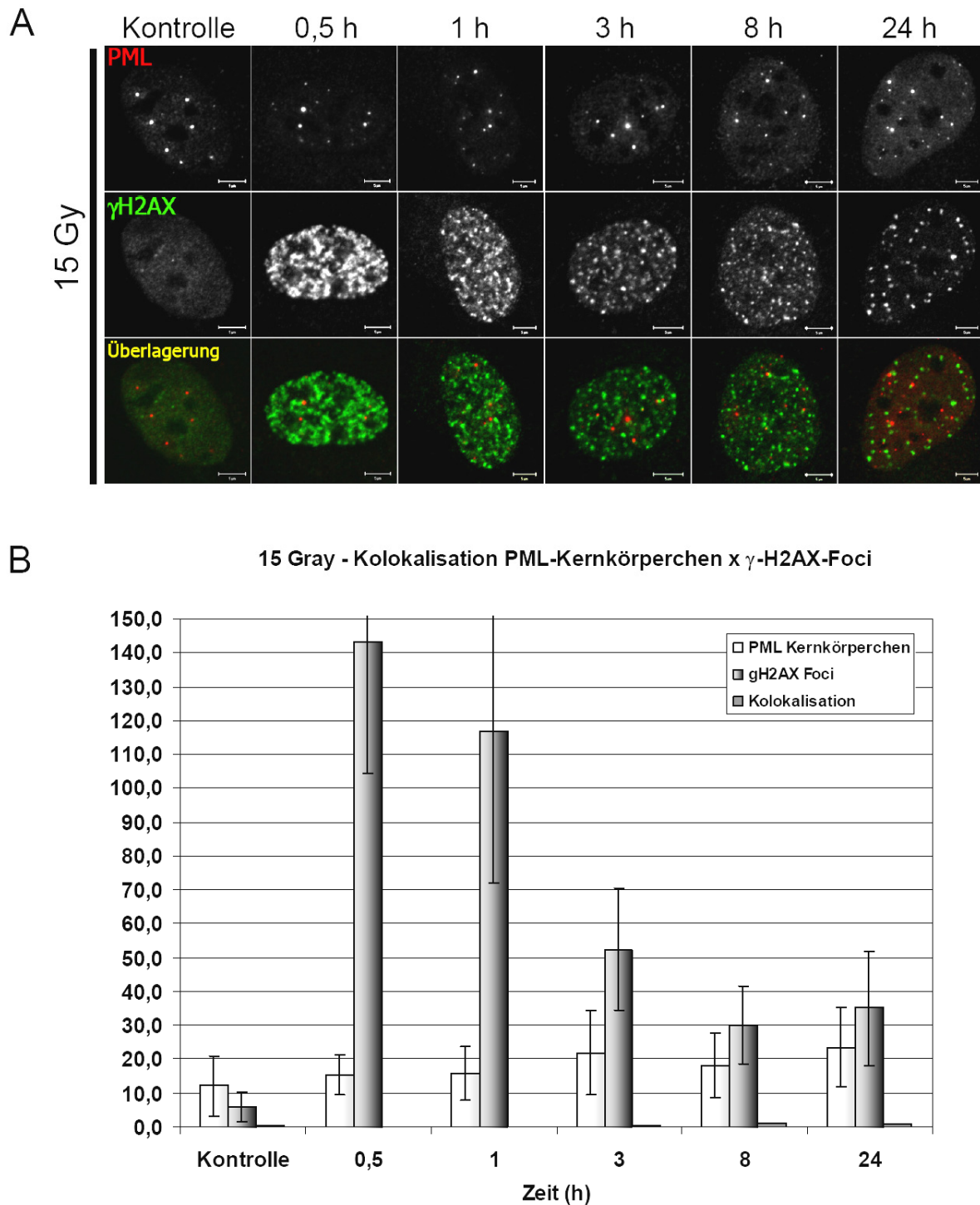


Abb. 4.16: Kolokalisation von γ -H2AX-Foci und PML-Kernkörperchen nach Bestrahlung mit 15 Gray in U2OS-Zellen. (A) Ausgewählte Zellkerne einer unbehandelten Zelle, sowie von Zellen zu den fünf verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung, in denen die γ -H2AX-Foci mit einem monoklonalen Mausantikörper (grün) und die PML-Kernkörperchen mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper (rot) angefärbt wurden. (B) Quantitative Auswertung der Anzahl der γ -H2AX-Foci, der PML-Kernkörperchen und der Anzahl der Kolokalisationen zwischen beiden Strukturen pro Zelle. Pro Zeitpunkt wurden 50 Zellen ausgewertet. Größenbalken: 5 μ m.

Abbildungen 4.15 und 4.16 zeigen die Immunfluoreszenzen und quantitativen Auswertungen für eine niedrige (2 Gray) und die höchste Bestrahlungsdosis (15 Gray).

In unbestrahlten U2OS Zellen wurden durchschnittlich 6 γ -H2AX-Foci und 12 PML-Kernkörperchen detektiert. In mit 2 Gray bestrahlten Zellen findet man nach 30 min durchschnittlich 46 γ -H2AX-Foci pro Zellkern und 18 PML-Kernkörperchen (Abb. 4.15, B). Nach einer Stunde ist die Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zellkern schon leicht zurückgegangen und nach 3 Stunden auf 19 gesunken. Nach 8 Stunden ist die Anzahl der γ -H2AX-Foci mit durchschnittlich 8 pro Zellkern fast wieder auf dem Wert unbehandelter Zellen. Daraus ist zu schließen, dass U2OS-Zellen, die mit 2 Gray bestrahlt wurden, über einen Zeitraum von 8 Stunden ihre DSBs erfolgreich reparieren. Im gleichen Zeitraum steigt auch die Zahl der PML-Kernkörperchen um das 1,5- bis 2-fache, ohne jedoch einen signifikanten Spitzenwert anzunehmen. Interessanterweise ist die Zahl der PML-Kernkörperchen nach 8 Stunden am höchsten, zu einem Zeitpunkt also, an dem die Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche annähernd abgeschlossen ist. Nach 24 Stunden ist die Anzahl der γ -H2AX-Foci und der PML-Kernkörperchen auf Kontrollwerte gesunken (Abb. 4.15, B).

Eine andere Kinetik zeigt sich bei der Analyse der mit 15 Gray bestrahlten U2OS-Zellen (Abb. 4.16): die Anzahl der γ -H2AX-Foci pro Zellkern beträgt nach 30 Minuten 143 und ist damit fast dreimal so hoch wie in den mit 2 Gray bestrahlten Zellen. Ähnlich der 2 Gray-Analyse nimmt die Zahl der Reparaturstellen danach ab, verharrt aber nach 8 Stunden auf hohem Niveau. Nach 24 Stunden sind immer noch durchschnittlich 35 γ -H2AX-Foci pro Zellkern vorhanden. Während sich die Anzahl der PML-Kernkörperchen in den ersten Stunden ähnlich entwickelt wie in mit 2 Gray bestrahlten Zellen, verharrt sie nach 24 Stunden auf einem Höchstwert von etwa 24 pro Zellkern. Diese Beobachtungen deuten an, dass mit 15 Gray bestrahlte Zellen die DNA-Reparatur nach 24 Stunden nicht abschließen können und dass dies mit der Aufrechterhaltung einer verdoppelten Zahl an PML-Kernkörperchen einhergeht. Die gleichen Analysen wurden mit U2OS-Zellen durchgeführt, die mit 4, 6, 8, 10 und 12 Gray bestrahlt worden waren. Solche Zellen zeigten ähnliche Kinetiken wie die in Abbildung 4.16 gezeigten. Lediglich die Anzahl der nach 24 Stunden verbliebenen γ -H2AX-Foci nahm proportional zur Bestrahlungsstärke zu (Abb. 4.17).

Die Doppel-Immunfluoreszenzfärbung ermöglichte schließlich eine Quantifizierung der Kolokalisation zwischen PML-Kernkörperchen und den DNA-Reparaturstellen. Überraschenderweise und im starken Kontrast zu bisherigen Literaturdaten (bis zu 60 % Kolokalisation, Carbone *et al.*, 2002) ist der Grad der Kolokalisationen in den hier

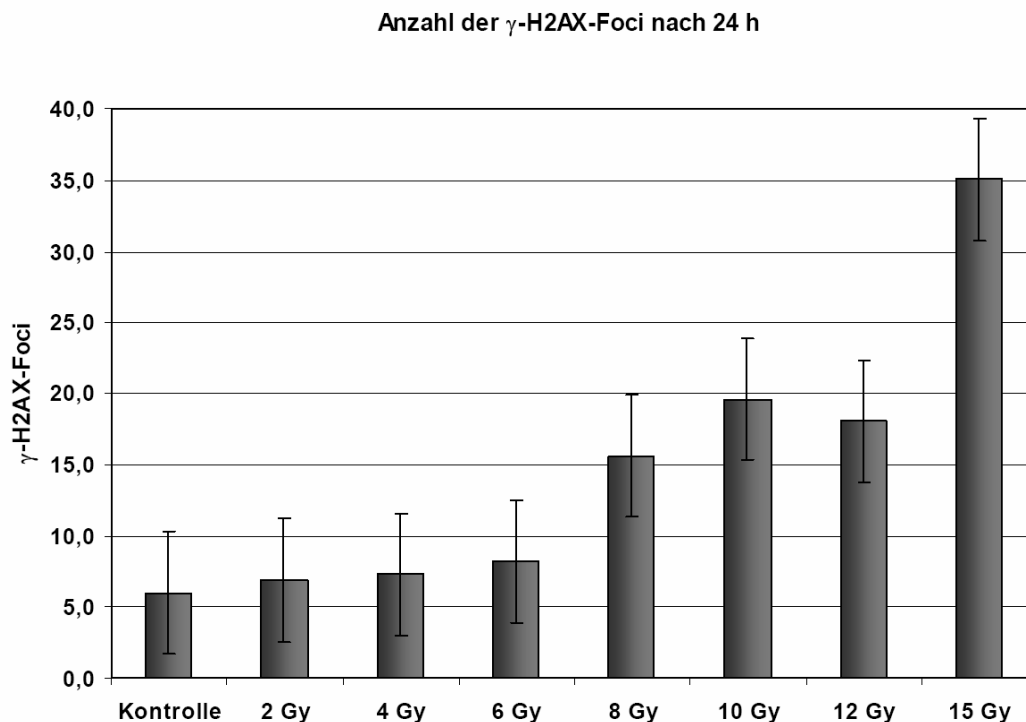


Abb. 4.17. Anzahl der γ -H2AX-Foci nach 24h. Die Anzahl der γ -H2AX-Foci in U2OS-Zellen nach 24 h ist von der Strahlungsdosis abhängig.

durchgeführten Analysen nur sehr gering. Dies zeigt sich qualitativ in den Überlagerungsbildern (Abb. 4.15, A; 4.16, A) und quantitativ (Abb. 4.15, B; 4.16, B). Durchschnittlich finden sich weniger als eine signifikante Kolo-kalisation zwischen den PML- und den γ -H2AX-Signalen. Selbst in Zellen mit Maximalwerten an γ -H2AX-Foci findet sich keine signifikante Kolo-kalisation mit PML-Kernkörperchen. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass in U2OS-Zellen Orte aktiver DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur nicht mit PML-Kernkörperchen räumlich assoziiert sind.

4.3.2 Vergleich der γ -H2AX-Kinetik und Überlebensrate in den Zelllinien U2OS und WI38

Die Kinetik der DSB-Reparatur und die PML-Dynamik wurde auch in der primären Fibroblasten-Zelllinie WI-38 analysiert. Im Gegensatz zu U2OS-Zellen sind WI-38-Zellen nicht immortal und sie enthalten einen normalen diploiden Chromosomensatz (Sugarman, B. J. *et al.*, 1985). Da man annimmt, dass die zellulären DNA-Schaden-Antworten in WI-38-

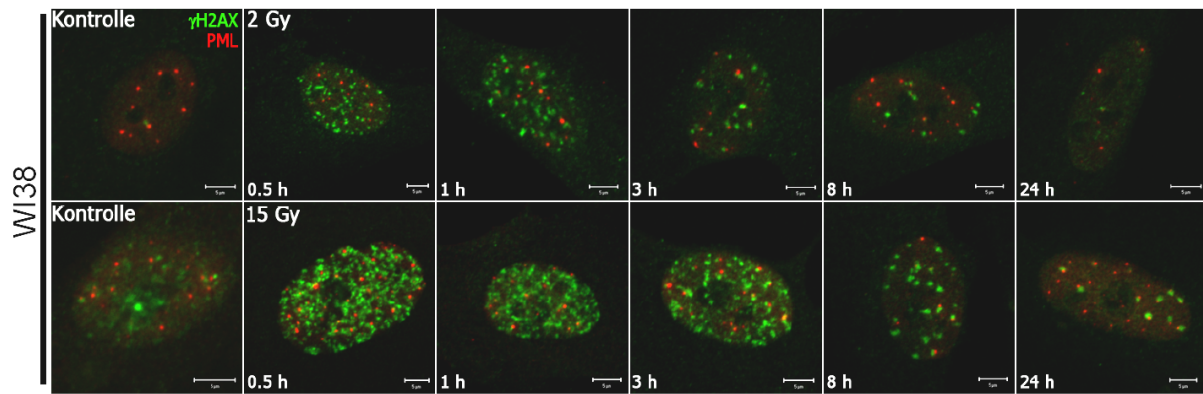


Abb. 4.18: Lokalisation von PML-Kernkörperchen und γ -H2AX-Foci in WI38-Zellen. Angefärbt wurden jeweils die PML-Kernkörperchen (rot) und die γ -H2AX-Foci (grün). Größenbalken: 5 μ m.

Zellen normal verlaufen, wurden WI-38-Zellen in der Mehrzahl der bisherigen Studien zur DNA-Doppelstrangbruchreparatur verwendet. Dies sollte einen Vergleich der hier gewonnen Daten mit den Literaturdaten ermöglichen. Ähnlich den U2OS-Zellen ist die Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche in mit 2 Gray bestrahlten WI-38-Zellen nach 24 Stunden abgeschlossen (Abb. 4.18, obere Reihe). Über einen Zeitraum von 8 Stunden wurden keine signifikanten Kollokalisierungen zwischen PML- und γ -H2AX-Signalen detektiert, weder in 2 Gray, noch in 15 Gray bestrahlten Zellen (Abb. 4.18). Unterschiede zeigten sich nach 24 Stunden. Im Gegensatz zu U2OS-Zellen zeigen WI-38-Zellen bei 15 Gray Bestrahlung nach 24 Stunden eine starke Assoziation zwischen PML Kernkörperchen mit vergrößerten γ -H2AX-Foci (Abb. 4.18, untere Reihe). Dieses Muster zeigten U2OS-Zellen nicht (Abb. 4.17, A).

Einige PML-Kernkörperchen zeigen auch schon nach 3 und 8 Stunden Assoziationen mit γ -H2AX-Foci, nach 24 Stunden war die Assoziation aber am deutlichsten. In der vergrößerten Darstellung (Abb. 4.19, untere Reihe) erkennt man, dass in fast allen Zellkernen des Übersichtsbildes starke Assoziationen und z. T. partielle Kollokalisierungen zwischen den PML-Kernkörperchen und den γ -H2AX-Akkumulationen bestehen.

Die oben beschriebene Beobachtung, dass Zellen bei einer Strahlendosis von 15 Gray nach 24 Stunden immer noch eine hohe Zahl an γ -H2AX-Foci aufwiesen, stimmt mit Literaturdaten überein und deutet auf eine Akkumulation so genannter irreparabler Doppelstrangbrüche hin (Tseng *et al.*, 1990; Soldatenkov *et al.*, 1986). Eine nicht erfolgreiche DSB-Reparatur, wie z.B. durch hohe Dosen DNA-schädigender Agenzien herbeigeführt, kann zu einem permanenten Zellzyklus-Arrest (zelluläre Seneszenz), zur Apoptose oder zur Onkogenese der betroffenen Zelle führen (Houtgraaf *et al.*, 2006). Um diese Möglichkeiten zu überprüfen,

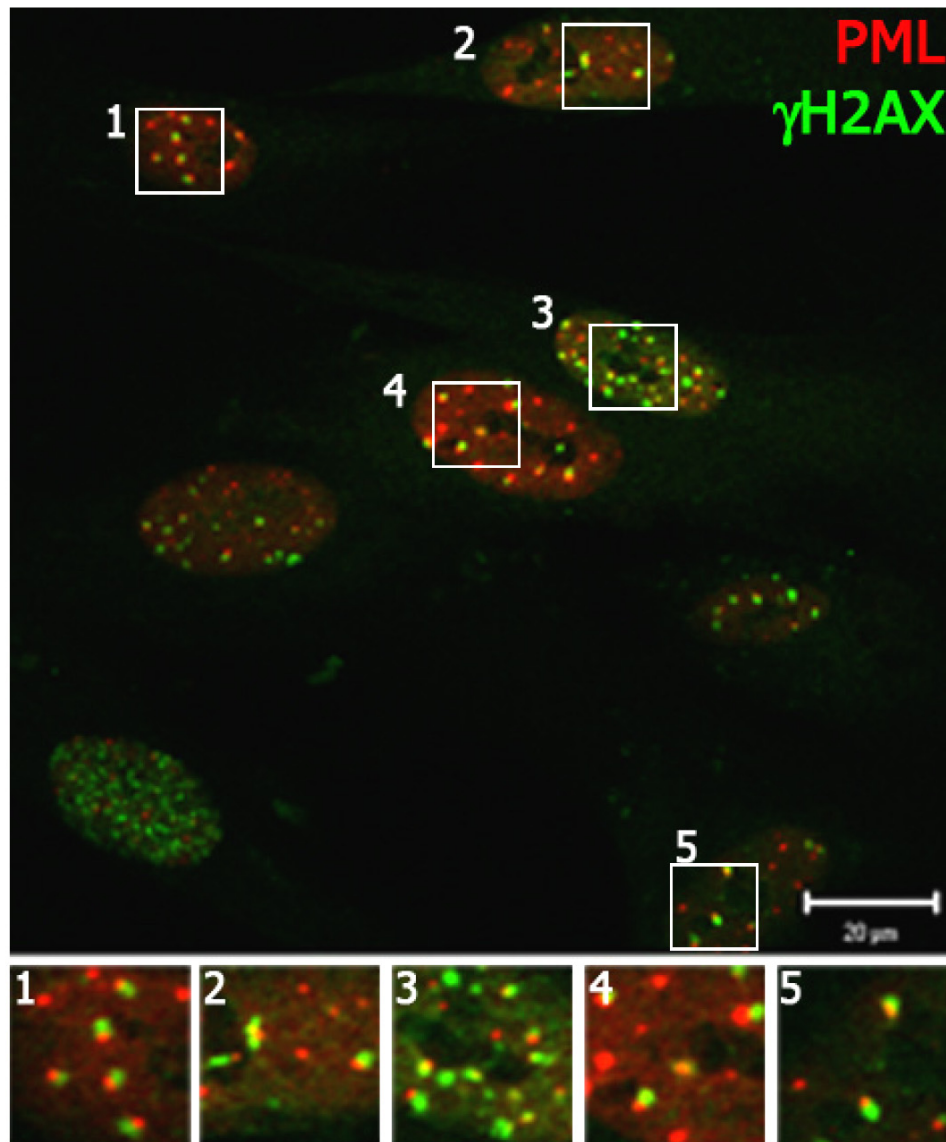


Abb. 4.19: Assoziation von PML-Kernkörperchen mit γ -H2AX-Foci in WI38-Zellen 24 Stunden nach der Bestrahlung mit 15 Gray. Die weißen Vierecke im Übersichtsbild markieren die vergrößerten Darstellungen der Zellkernbereiche am unteren Bildrand. Größenbalken: 20 μ m.

wurde die Überlebensfähigkeit von U2OS- und WI-38-Zellen in einem „Colony-forming-assay“ nach einer Bestrahlung der Zellen mit 2 Gray bzw. 15 Gray überprüft (Abb. 20).

Bei den mit 2 Gray bestrahlten Zellen verringert sich die Anzahl der U2OS-Kolonien auf 41 %, bei den WI-38-Zellen auf 43 % bezogen auf die Anzahl der Kolonien, die die unbehandelten Zellen gebildet hatten. Bei 15 Gray Bestrahlung haben sich nach zehn Tagen fast keine Kolonien mehr gebildet. Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Zell-Typen Schäden durch eine Bestrahlung von 2 Gray zum größten Teil erfolgreich reparieren. Eine Dosis von 15 Gray ist dagegen sowohl für U2OS, als auch für WI-38-Zellen letal.

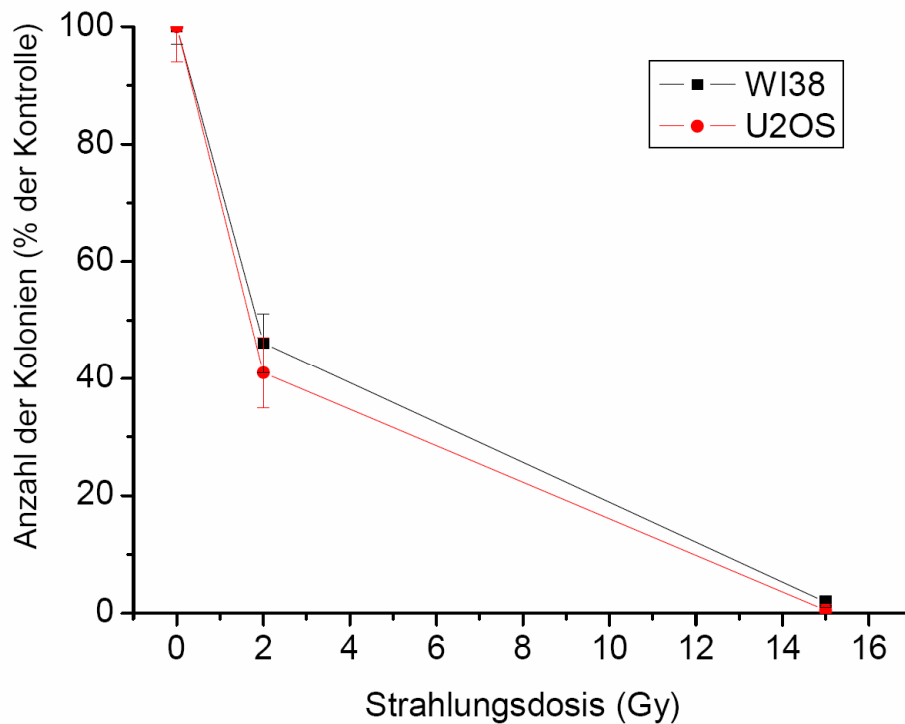


Abb. 4.20: „Colony-forming-assay“ mit U2OS- und WI-38-Zellen nach der Bestrahlung mit 2 Gray oder 15 Gray. Aufgetragen ist die Anzahl der Zellkolonien in Prozent bezogen auf die Anzahl der Zellkolonien der unbehandelten Zellen.

4.3.3 Topologie von PML-Kernkörperchen, DSBs und dem DNA-Reparaturprotein NBS1 nach Applikation von DNA-Schäden mit einem UV-A-Mikrostrahl

Eine mögliche Assoziation zwischen PML-Kernkörperchen und DNA-Reparaturstellen wurde zusätzlich in einem alternativen Ansatz analysiert. Dazu wurden mit Hilfe eines UV-A-Mikrostrahls der Wellenlänge 337 nm lokal begrenzte DNA-Schädigungen in die Zellkerne von lebenden HEp-2-Zellen eingefügt. Drei Stunden nach der Bestrahlung, d.h. zu einem Zeitpunkt hochaktiver DSB-Reparaturaktivität in den Zellkernen, wurde dann die relative Lokalisation von PML, DSB-Foci und NBS1 bestimmt. NBS1 ist Bestandteil des trimeren MRN-Komplexes, welcher als so genannter DSB-Sensor schnell und spezifisch an Doppelstrangbrüchen während der gesamten Reparaturzeit dynamisch akkumuliert (Zhang *et al.*, 2006). Zum Nachweis von NBS1 in dieser Positivkontrolle wurde ein Antikörper gegen Phospho-Serin 343 von NBS1 verwendet. Dieser Antikörpernachweis ist spezifisch für aktiviertes NBS1 nach Doppelstrangbruch-Induktion (Bekker-Jensen *et al.*, 2006).

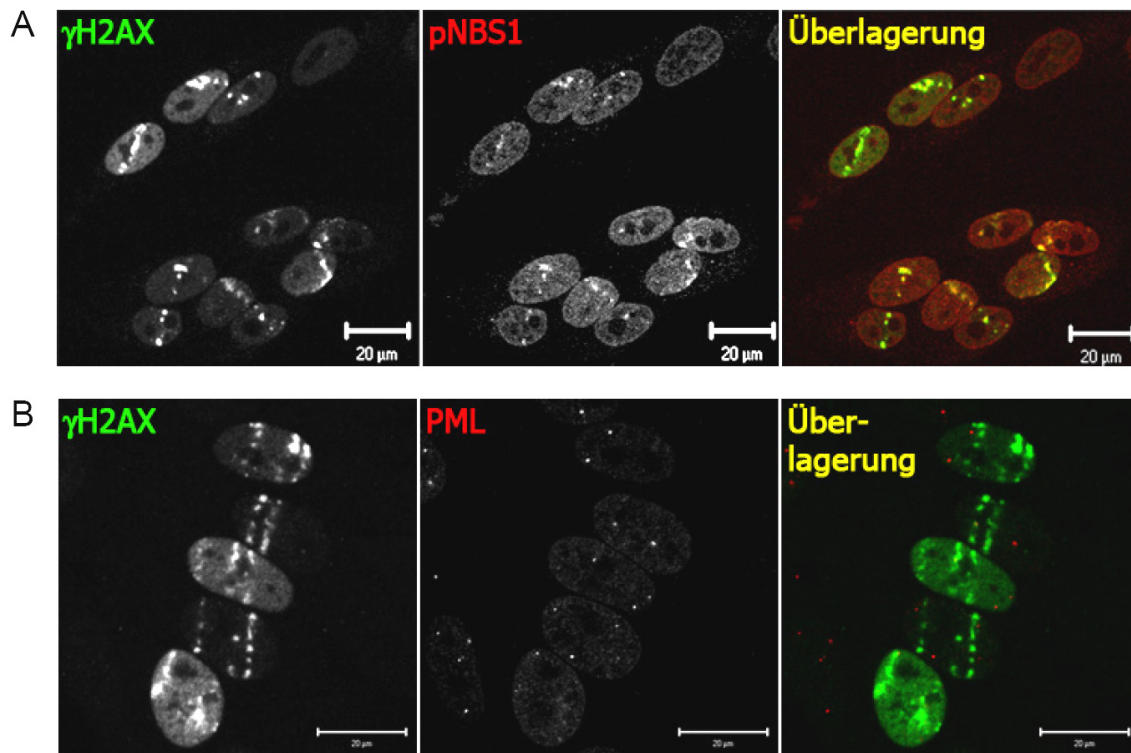


Abb. 4.21: Lokalisation der PML-Kernkörperchen und des phosphorylierten NBS1 in Zellkernen von HEp-2-Zellen nach Bestrahlung mit einem UV-A-Mikrostrahl. (A und B) Die Orte der DNA-Schäden wurden mit einem monoklonalen Mausantikörper gegen γ -H2AX angefärbt (grün), in (A) wurde mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen pNBS1 gegengefärbt (rot), in (B) mit einem polyklonalen Kaninchenantikörper gegen PML (rot). Größenbalken: 20 μ m.

Im Kontrollansatz kolokalisiert die phosphorylierte Form von NBS1, wie erwartet, in hohem Maß mit den Orten der DNA-Schäden (Abb. 4.21, A), während keine Kolokalisation zwischen γ -H2AX- und PML-Signalen beobachtet wird (Abb. 4.21, B).

Diese Beobachtungen bestätigen die zuvor beschriebenen Resultate aus den Ionenbestrahlungs-Experimenten, die keine signifikanten Kolokalisationen zwischen PML und DNA-Reparaturstellen identifiziert hatten. Auch an DNA-Reparaturstellen durch UV-A Mikrostrahl findet folglich keine Neuformierung von PML-Kernkörperchen statt.

4.3.4 Lokalisation des DNA-Reparaturproteins NBS1 an den PML-Kernkörperchen

Die Kolokalisation von DNA-Reparaturproteinen wie z.B. BLM, Mre11, Rad50, NBS1 und ATM mit PML-Kernkörperchen ist in der Literatur gründlich dokumentiert und hat die Vermutung genährt, dass diese Kernstrukturen eine essenzielle Rolle bei der DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur spielen (Everett *et al.*, 1999; Carbone *et al.*, 2002; Dellaire und Bazett-Jones, 2004). Nachdem durch oben beschriebene Beobachtungen eine physische

Assoziation von PML-Kernkörperchen mit DSB-Reparaturstellen widerlegt war, sollte nun auch überprüft werden, ob NBS1 während des DSB-Reparaturprozesses tatsächlich an PML-Kernkörperchen akkumuliert.

Dazu wurden U2OS- und WI38-Zellen mit 2 Gray oder 15 Gray bestrahlt und nach verschiedenen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mittels Antikörperfärbung gegen die phosphorylierte Form des Reparaturproteins NBS1 und das PML-Protein analysiert (Abb. 4.22). Dieses Experiment zeigt, unabhängig von der Bestrahlungsdosis und dem Zeitpunkt der Analyse, eine signifikante Akkumulation von Phospho-Ser343-NBS1 an den PML-Kernkörperchen in etwas weniger als der Hälfte aller Zellen (Abb. 4.22). Interessanterweise zeigte dieses Experiment zwei klar unterscheidbare Populationen an Zellen in Bezug auf den Kollokalisationsphänotyp: in Zellen mit Kollokalisation wurde pNBS1 in allen PML-Kernkörperchen identifiziert. In Zellen ohne Kollokalisation war pNBS1 nie in PML-Kernkörperchen akkumuliert, sondern größtenteils homogen im Nukleoplasma verteilt. Lediglich zu den Zeitpunkten 3 Stunden und 24 Stunden, am deutlichsten aber nach der Bestrahlung mit 15 Gray nach 24 Stunden, erkennt man zusätzliche, kleinere Akkumulationen von phosphoryliertem NBS1 im Nukleoplasma, die aber nicht mit PML kollokalisieren (Abb. 4.22).

Die quantitative Analyse ergab, dass in 35 % der unbehandelten Zellen Ser 343-phosphoryliertes NBS1 in den PML-Kernkörperchen akkumuliert (Diagramm 4.1). Die Anwesenheit von DNA-Doppelstrangbrüchen im Chromatin ist folglich nicht die Ursache der Akkumulation von phosphoryliertem NBS1 in PML-Kernkörperchen. Möglicherweise ist die Akkumulation von Ser 343-phosphoryliertem NBS1 an den PML-Kernkörperchen Zellzyklus-abhängig. Nach drei Stunden zeigt sich eine Zunahme der Zellen mit Kollokalisation von 35 % auf einen Spitzenwert von 48 % bei 2 Gray Bestrahlung, gefolgt von einer Abnahme auf Kontrollwerte (Diagramm 4.1).

Auch mit 15 Gray bestrahlte Zellen zeigten nach drei Stunden zunächst einen Kollokalisations-Höchstwert von 54 % während des Reparaturprozesses, der dann auch wieder auf Kontrollwerte absinkt (Diagramm 4.1). Im Gegensatz zu den mit 2 Gray bestrahlten Zellen nimmt aber dann der Anteil der Zellen mit Kollokalisation zwischen pNBS1 und PML auf 70 % wieder drastisch zu. Da diese Zellen, wie im "Colony-forming Assay" gezeigt (Abb. 4.20), bei weiterer Kultivierung sterben, deutet sich hier vermutlich eine Korrelation zwischen der pNBS1/PML-Kollokalisation und Apoptose an.

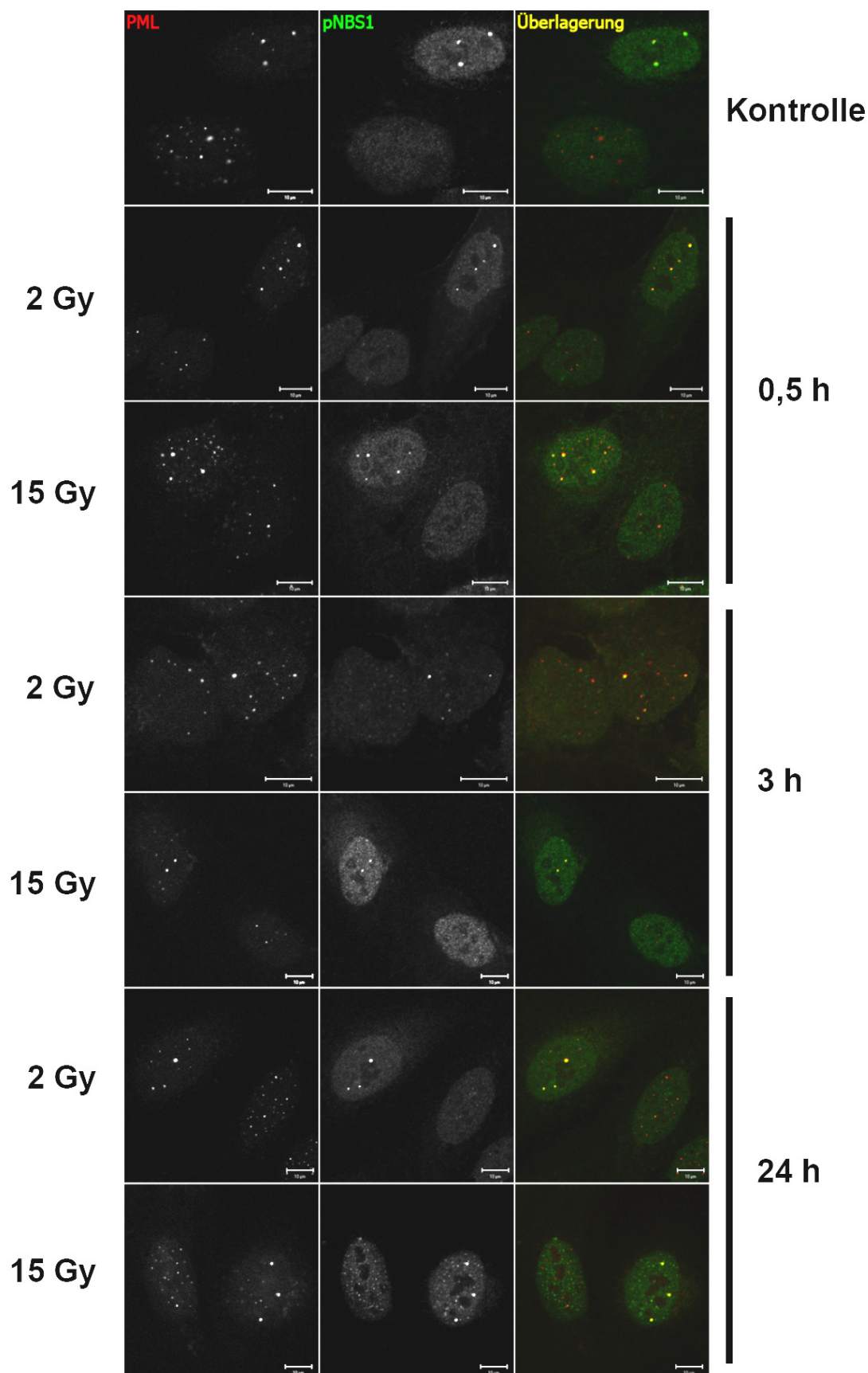


Abb. 4.22: Lokalisation des DNA-Reparaturproteins pNBS1 und der PML-Kernkörperchen in U2OS-Zellen nach der Bestrahlung mit 2 Gray, bzw. 15 Gray. Gegen das Protein PML wurde ein monoklonaler Mausantikörper eingesetzt (rot), gegen das phosphorylierte NBS1-Protein ein polyklonaler Kaninchenantikörper (grün). Größenbalken: 5 μm.

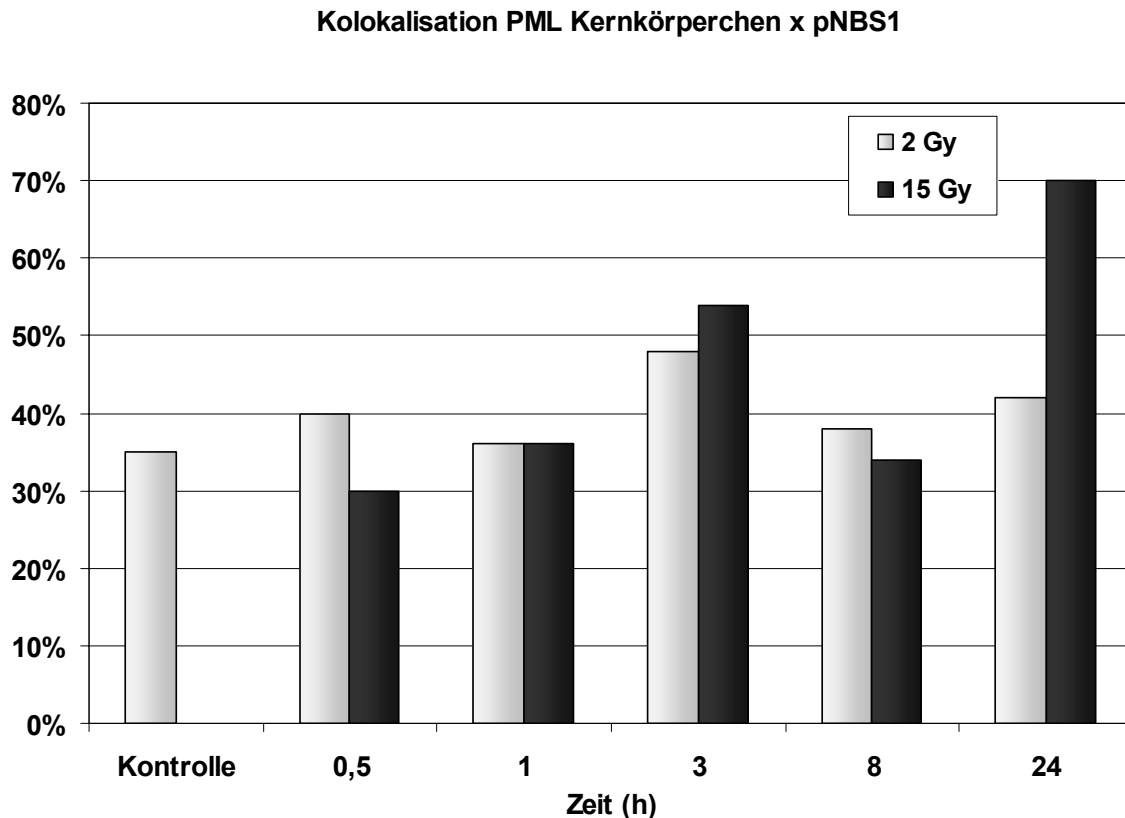


Diagramm 4.1: Quantitative Auswertung zur Kolokalisation von PML-Kernkörperchen und pNBS1 in U2OS-Zellen. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Zellen, die Kolokalisation von PML-Kernkörperchen und phosphoryliertem NBS1 zeigen (N=50). Die Standardabweichung war kleiner als 5 %.

Ein leichter Anstieg an Zellen mit pNBS1/PML-Kolokalisation zwischen 8 und 24 Stunden ist auch in mit 2 Gray bestrahlten Zellen zu verzeichnen (Diagramm 4.1). Da auch diese Bedingungen für einen Teil der Zellen letal sind (Abb. 4.20), reflektiert die erneute Zunahme der Zellen mit Kolokalisation 24 Stunden nach einer Bestrahlung mit 2 Gray vermutlich den Übergang einer Subpopulation in die Apoptose.

Zusammenfassend konnte hier widerlegt werden, dass PML-Kernkörperchen mit DNA-Doppelstrangbruchstellen während ihrer Reparatur kolokalisieren. Die Zunahme an Zellen, die Kolokalisation zwischen den PML-Kernkörperchen und Ser 343-phosphoryliertem NBS1 zeigen, und die starke Assoziation von PML-Kernkörperchen mit γ -H2AX-Akkumulationen in Zellen 24 Stunden nach der Bestrahlung mit 15 Gray, stellen die PML-Kernkörperchen eher in einen Zusammenhang mit Prozessen, die einer nicht erfolgreichen DNA-Reparatur nachgeschaltet sind.

5 Diskussion

Unter den verschiedenen nukleären Domänen des Zellkerns höherer Eukaryoten zählen die Centromer-/Kinetochorkomplexe und die PML-Kernkörperchen zu den Strukturen, die während des gesamten Zellzyklus vorhanden sind (Lamond und Earnshaw, 1998). Nichtdestoweniger verändert sich funktionsbedingt ihre biochemische Zusammensetzung im Laufe des Zellzyklus (Amor *et al.*, 2004; Negorev und Maul, 2001). Mit einer Kombination der Techniken FRAP und FCS versucht diese Arbeit erstmals, das gesamte Spektrum der Beweglichkeiten der Proteinkomponenten an diesen nukleären Strukturen vom Nanosekunden- bis in den Stundenbereich aufzulösen. Die gewonnenen Daten erlauben neue Aussagen zum Assemblierungsmechanismus und den Funktionsweisen von Centromeren und PML-Kernkörperchen. Um darüberhinaus PML-Kernkörperchen funktionell näher zu charakterisieren, wurde ihre Zellkerntopologie in Bezug auf Orte aktiver DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur 4-dimensional (x, y, z, t) untersucht.

Es ist wichtig zu bedenken, dass die kinetischen Daten unter Verwendung von EGFP-Fusionsproteinen ermittelt wurden. Obwohl die Fusionsproteine über den gesamten Zellzyklus identische Lokalisationsmuster aufwiesen wie ihre endogenen Gegenstücke, als Vollelänge-Proteinprodukte exprimiert und nur Zellen mit sehr geringer Expression für Messungen herangezogen wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich die Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Dynamik nicht komplett identisch verhalten wie die endogenen Proteine. Insofern beschreiben die Daten nur eine (hoffentlich ausreichende) Annäherung an die reale Situation.

Auf der anderen Seite wäre es für den zweifelsfreien Ausschluß von Artefakten notwendig, das endogene Gen komplett durch ein EGFP-Fusionsprotein-Gen im Genom der zu untersuchenden Zellen zu ersetzen. So wünschenswert dies ist, der für diesen Ansatz notwendige Aufwand wäre unverhältnismäßig hoch. Im Fall der EGFP-HP1 β -transgenen Maus (Herstellungszeit 2 bis 3 Jahre) wurde dieser Ansatz realisiert und führte im Vergleich zu transient transfizierten Zellen zu identischen Kinetikdaten von GFP-HP1 β (Festenstein *et al.*, 2003; Cheutin *et al.*, 2003).

5.1 Assemblierung des inneren Kinetochors

Um den Aufbau und die Funktion des Kinetochorkomplexes zu verstehen, ist es notwendig, seine einzelnen Komponenten zu kennen und diese bezüglich ihrer Interaktionen und ihres dynamischen Verhaltens genau zu charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Dynamik der inneren Kinetochorproteine CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-H, CENP-I und hMis12 in FRAP- und FCS-Experimenten in lebenden Zellen untersucht. Diese Analysen erlauben neue Einblicke in den Assemblierungsmechanismus und die Funktionsweise des Centromers.

5.1.1 Die inneren Kinetochorproteine bilden eine stabile Basis am Centromer

Die FRAP-Analysen haben gezeigt, daß mit Ausnahme von hMis12 die Proteine des inneren Kinetochors während des gesamten Zellzyklus sehr stabil in den Centromer-/Kinetochorkomplex eingebaut sind. hMis12 wird hingegen während der Interphase sehr schnell und vollständig an den Kinetochoren ausgetauscht, in der Mitose aber bindet es ebenfalls stabil an diesen Multiproteinkomplex. Außerhalb des Kinetochors zeigen die inneren Kinetochorproteine eine hohe Mobilität, die die Eigenschaft anomaler Diffusion aufweist.

Die Histonvariante CENP-A ersetzt das Histon H3 in den Nukleosomen des Centromerbereiches (Meluh *et al.*, 1998). Die aus den Langzeit-FRAP-Experimenten berechnete theoretische Fluoreszenzhalberholzeit von 962 Minuten (Tabelle 4.1) zeigt, dass der Austausch von CENP-A noch langsamer abläuft als der Austausch des Histons H3, das eine Fluoreszenzhalberholzeit von etwa 510 Minuten in den Nukleosomen des nicht-centromerischen Chromatins zeigt (Kimura und Cook, 2001). Legt man zugrunde, dass der Zellzyklus der hier eingesetzten HEP-2-Zellen 18 bis 20 Stunden dauert, kann man davon ausgehen, dass ein Teil des im Centromer-Chromatin eingebauten CENP-A über einen Zellzyklus hinaus von einer Generation in die nächste weitergegeben wird. Damit ist zunächst die Definition des Centromerbereiches in der nächsten Zellgeneration über den stabilen Einbau von CENP-A gewährleistet, denn CENP-A ist für den Einbau der meisten anderen Kinetochorproteine in das Centromer notwendig (Howman *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2006). Darüber hinaus konnte kürzlich gezeigt werden, dass ein Anteil von nur etwa 10 % CENP-A

in den Centromer-Kinetochorbereichen von Hela-Zellen ausreichend ist für den Aufbau vollständiger Kinetochore. Folglich führt selbst die Halbierung der CENP-A-Menge am Kinetochor nach erfolgter Replikation ohne nachfolgenden CENP-A-Neueinbau nicht zum Funktionsverlust von Centromeren in der nächsten Mitose (Liu et al., 2006).

Die EGFP-Fusionsproteine von CENP-C, CENP-I und eine Subpopulation von CENP-B werden mit sehr ähnlichen theoretischen Fluoreszenzhalberholzeiten etwas schneller ausgetauscht als CENP-A (CENP-C: 512 min, CENP-I: 555 min, CENP-B: 549). Das deutet daraufhin, dass diese Proteine eventuell durch denselben Mechanismus am Kinetochor eingebaut werden. Es ist bislang allerdings nicht bekannt, ob für diese Kinetochorproteine spezielle Lade-Mechanismen bzw. -Faktoren existieren. Bei den immer noch sehr langsamen Halberholzeiten kann auch bei diesen drei Proteinen ein Teil der Proteine über einen Zellzyklus hinaus fest am Kinetochor eingebaut bleiben und der Aufrechterhaltung dieser Struktur in der nächsten Zellgeneration dienen. Auch in der Mitose bleiben diese Proteine zum größten Teil fest am Kinetochor eingebaut, ungefähr 60 % von EGFP-CENP-B, 95 % von EGFP-CENP-C und 90 % von EGFP-CENP-I sind auch während der Mitose am Kinetochor immobilisiert (Tabelle 4.1).

Das Protein CENP-H zeigt eine zweifach schnellere Austauschrate im Vergleich zu CENP-C und CENP-I mit einer theoretischen Halberholzeit von 275 min. Diese etwas schnellere Austauschzeit könnte auf eine Lokalisation etwas außerhalb des stabilen Kerns, den CENP-A, -B, -C und -I bilden, hindeuten. CENP-H kann außerdem mit sich selbst interagieren (Sugata et al., 2004) und könnte so wie eine Art Schutzschicht den inneren Kernbereich des Kinetochors stabilisieren und nach außen abgrenzen. Außerdem muss CENP-H als "Plattform" zur Lokalisierung von CENP-C und CENP-I am Kinetochor vorhanden sein (Nishihashi et al., 2002). Daher könnte CENP-H auch als Adapter für die Bindung anderer Kinetochorproteine dienen. So konnte von unserer Arbeitsgruppe in Knock-down-Experimenten gegen CENP-H in humanen Zellen gezeigt werden, dass das Kinetochor-assoziierte Mikrotubuli-bindende Motorprotein CENP-E in CENP-H-depletierten Zellen nur noch teilweise an den Kinetochoren lokalisiert ist (Orthaus et al., 2006).

Neben CENP-A besitzen auch CENP-B und CENP-C die Fähigkeit, direkt an die DNA im centromerischen Bereich zu binden (Sullivan et al., 1994; Sugimoto et al., 1994; Masumoto et al., 1989). Dabei ist für die Lokalisierung von CENP-C am Kinetochor die Anwesenheit von

CENP-A erforderlich (Howman *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2006), außerdem konnte in Yeast-two-hybrid-Studien die direkte Interaktion von CENP-C und CENP-B nachgewiesen werden (Suzuki *et al.*, 2004). Es wird angenommen, dass die mit diesen Eigenschaften ausgestatteten Proteine CENP-A, CENP-B und CENP-C eine Konformationsänderung im centromerischen Chromatin bewirken können, um so als "Präkinetochorkomplex" eine Plattform für die Bindung der nachfolgenden Kinetochorproteine zu bilden (Ando *et al.*, 2002; Schueler und Sullivan, 2006). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten geringen Austauschraten dieser Proteine am Kinetochor unterstützen dieses Modell und es liegt nahe, dass auch CENP-I und CENP-H zu diesem Komplex beitragen.

Die extrem hohe innere Stabilität des inneren Kinetochors ist vermutlich auf multiple, synergistische, kooperative und DNA-einbeziehende Kontakte aller Bindepartner zurückzuführen. Diese Annahme wird durch FRET- und FLIM-Analysen, die ein spezifisches Interaktionsnetzwerk von CENP-A, CENP-B, CENP-C und CENP-I demonstrieren, unterstützt (Orthaus *et al.*, Manuskript in Vorbereitung). Auch die in der vorliegenden Arbeit gezeigten FRAP-Experimente mit Deletionsvarianten der Kinetochorproteine CENP-B und CENP-C stützen diese Annahme (Abb.4.7).

Die geringe Austauschrate von CENP-I und CENP-H am Kinetochor stützt auch die Beobachtung, dass der von Okada und Kollegen (2006) beschriebene CENP-H-I-Multiproteinkomplex als Marker beim Einbau von neu-synthetisiertem CENP-A in die Nukleosomen des centromerischen Chromatins dienen kann. Man könnte sich vorstellen, dass die im Zellkern ständig präsente Austauschmaschinerie für das Histon H3 (Kimura und Cook, 2001) in der G2-Phase den CENP-A-Einbau am Kinetochor erledigt, denn nur in dieser Zellzyklusphase steht neu-synthetisiertes CENP-A zur Verfügung (Shelby *et al.*, 2000). Das setzt voraus, daß die Konzentration von "freiem" CENP-A am Centromer-/Kinetochorbereich lokal hochgehalten wird, möglicherweise eben durch die Interaktion von CENP-A mit dem CENP-H-I-Multiproteinkomplex. In diesem Modell wäre der CENP-H-I-Komplex ein CENP-A-Ladefaktor.

Die Histonvariante CENP-A gilt als der beste epigenetische Marker für das Centromer (Henikoff und Dalal, 2005). Die in den Langzeit-FRAP-Messungen gewonnenen Daten unterstützen diese Annahme und werfen die Möglichkeit auf, dass auch die dauerhafte Präsenz von CENP-C und CENP-I im Centromerbereich der Chromosomen dazu beitragen,

diesen Bereich epigenetisch zu markieren. Obwohl das Protein CENP-B ebenfalls sehr stabil an diesen Bereich gebunden ist, scheidet es wohl als weiterer Kandidat für die epigenetische Markierung des Centromerbereichs aus, da es an voll funktionsfähigen, menschlichen Neocentromeren gar nicht vorhanden ist (Saffery *et al.*, 2000). Die Rolle von CENP-B ist allerdings nicht vollständig geklärt. Weitere Versuche sind notwendig und in Vorbereitung, um hier mehr Klarheit zu erhalten. Insbesondere sind die Effekte einer CENP-B-Depletion durch siRNA in menschlichen Zellen noch nicht untersucht worden.

5.1.2 Die Mobilät von Kinetochorproteinen außerhalb der Centromere beruht auf anomaler Diffusion

FCS-Autokorrelationskurven für diffusible Zellkernproteine können mit einem Zweikomponenten-Modell für freie Diffusion oder einem Einkomponenten-Modell für anomale Diffusion analysiert werden (Wachsmuth *et al.*, 2000; Baudendistel *et al.*, 2005). Man erhält dabei mit dem Zweikomponenten-Modell zwei Molekül-Fraktionen, die sich in einen Anteil, der auf freier Brown'scher Molekularbewegung basiert, und einen Anteil, der transient gebundene Moleküle repräsentiert, aufgliedern. Bei Auswertung über das anomale Diffusions-Modell erhält man kinetische Daten zu einer Molekülpopulation und dessen Anomalie-Parameter. Der Anomalieparameter beschreibt den Grad der Obstruktion des diffundierenden Teilchens. In der vorliegenden Arbeit wurden die FCS-Autokorrelationsdaten mit einem Einkomponenten anomalen Diffusionsmodell analysiert, weil diese Annahme die Diffusionsbedingungen im Molekül-dichten Zellkern am besten widerspiegelt (Wachsmuth *et al.*, 2006; Mangenot *et al.*, 2003; Banks und Fradin, 2005).

Die Diffusionskoeffizienten für die Fluoreszenz-markierten Proteine CENP-A, CENP-B, CENP-I und CENP-H betrugen 1,40, 0,92, 2,20 bzw. 3,19 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ mit Standardabweichungen zwischen 5-10 %. Da dieselben Werte in vielen unabhängigen Experimenten und in anderen Zellen reproduzierbar gemessen wurden, kann davon ausgegangen werden, dass jedes dieser inneren Kinetochorproteine ein individuelles Diffusionsverhalten im Nukleoplasma besitzt. Dies ist ein indirekter Hinweis darauf, dass die inneren Kinetochorproteine außerhalb der Centromere nicht oder nur in geringem Maße in gemeinsame Komplexe eingebunden sind. Daher gehen Sie wahrscheinlich erst bei ihrem Zusammentreffen am Centromer stabile Interaktionen ein, die zur Bildung des inneren Kinetochors führen. Ein definitiver Beweis müsste hier aber durch Fluoreszenz-Kreuzkorrelations-Spektroskopie-(FCCS-) Experimenten

geführt werden, mit denen quantitative Protein/Protein-Interaktionen direkt gemessen werden können (Baudendistel *et al.*, 2005; Bacia *et al.*, 2006).

Die Anomalieparameter zwischen 0,46 und 0,65 aus der Anpassung der Autokorrelationskurven an das Modell für die dreidimensionale, anomale Diffusion zeigen, dass die Proteine nicht frei im Nukleoplasma diffundieren, sondern ihre Diffusion durch die Umgebung im Nukleoplasma u. U. durch Kollisionen mit nukleären Strukturen und transiente Interaktionen eingeschränkt ist (Wachsmuth *et al.*, 2000). Bei freier Diffusion von Partikeln in Lösung hingegen, wenn das mittlere Verschiebungsquadrat $\langle r^2 \rangle$ proportional der Zeit bleibt, behält der Anomalieparameter den Wert 1. Für Proteine in einer Dextran-Lösung mit einer Konzentration von 400 g/l, die annähernd der Partikelkonzentration in einem Zellkern entspricht, und die mit den Dextranen nicht interagieren können, wurde ein maximaler Anomalieparameter von 0,75 gemessen (Banks und Fradin, 2005). Dieser Wert wurde hier bestätigend für freies EGFP, das ebenfalls keine oder nur sehr schwache Interaktionen mit anderen nukleären Proteinen eingeht, im Zellkern festgestellt. Die insgesamt niedrigeren Anomalieparameter der inneren Kinetochorproteine weisen neben der Behinderung der Diffusion dieser Proteine durch die dicht gepackte Umgebung des Nukleoplasmas auf transiente Interaktionen der Proteine mit anderen Proteinen hin. Der sehr niedrige Anomalieparameter von CENP-B mit 0,46 könnte ein Hinweis darauf sein, dass CENP-B, das eine DNA-bindende Domäne besitzt, zusätzlich unspezifisch und transient mit Chromatin interagiert.

Die trotz der Behinderungen im Nukleoplasma gemessene hohe Mobilität der nukleoplasmatischen Fraktionen der inneren Kinetochorproteine zeigt, dass sie nicht durch aktiven Transport zu ihrem eigentlichen Einsatzort am Centromer-/Kinetochorkomplex gelangen, sondern in ungerichteter Bewegung durch den Zellkern diffundieren und so stochastisch eine geeignete Bindungsstelle finden können.

5.1.3 Die Immobilisierung von hMis12 während der Mitose

Die FRAP-Experimente haben hMis12 in der Interphase als einzige mobile Komponente unter den inneren Kinetochorproteinen identifiziert (Abb. 4.5). Innerhalb von ca. 100 Sekunden wird die gesamte hMis12 Population am Kinetochor einmal komplett ausgetauscht. In der Mitose wird hMis12 dagegen am Centromer immobilisiert. Mit diesem Wechsel im

dynamischen Verhalten nimmt hMis12 möglicherweise eine wichtige Sonderstellung unter den Proteinen des inneren Kinetochors ein. Ein ähnlicher Wechsel im dynamischen Verhalten während des Zellzyklus wurde auch beim Cohesin-Multiprotein-Komplex beobachtet (Gerlich *et al.*, 2006). Ursache sind wahrscheinlich die sich ändernden funktionellen Erfordernisse am Kinetochor während der Chromosomen-Segregation. Möglicherweise kann hMis12 beim Übergang der Zelle in die Mitose durch seine Immobilisierung eine stabile Plattform für die Bindung von Proteinen des äußeren Kinetochors, wie Hec-1 und Zwint-1 (Obuse *et al.*, 2004) und des kinesin-ähnlichen Motorproteins CENP-E bilden. Über CENP-E werden auch die Mikrotubuli des Spindelapparates am Kinetochor verankert (Putkey *et al.*, 2002). Somit würde hMis12 eine Funktion bei der Zugkraftübertragung während der mitotischen Chromosomenwanderung, die eine hochstabile Verbindung zwischen Mikrotubuli und Centromer erforderlich macht, zukommen. Unterstützt wird diese Annahme durch den Befund, dass hMis12-Depletion durch siRNAs einen Verlust der stabilen Verbindung zwischen den Kinetochoren und den Mikrotubuli verursacht (Kline *et al.*, 2006), eine Fehlfunktion, die erwartungsgemäß zu Chromosomen-Fehlverteilungen führt (Goshima *et al.*, 2003a).

Alternativ oder zusätzlich könnte hMis12 durch seine nachgewiesene Interaktion mit Heterochromatinprotein-1 (HP1) (Obuse *et al.*, 2004) für eine elastische, aber festere Verankerung des Kinetochorkomplexes mit dem umgebenden Heterochromatin sorgen, zumal ein signifikanter Anteil der Isoform HP1 α beim Übergang in die Mitose am Centromer immobilisiert wird (Schmiedeberg *et al.*, 2004). Zusammen mit den aus den FRAP-Experimenten gewonnenen Daten kann so hMis12 eine wichtige strukturelle Funktion in der Mitose zugeordnet werden, die möglicherweise zur mechanischen Stabilität zwischen Kinetochoren und Mikrotubuli beiträgt.

Wie wird die Mobilitätsänderung von hMis 12 bewerkstelligt? Dieser Prozess könnte über eine posttranslationale Modifikation am hMis12-Protein selber oder an der hMis12-Bindestelle am inneren Kinetochor ablaufen. In *Schizosaccharomyces pombe* wird Mis12 bspw. durch die Phosphatase Ppe1 und die Kinase Gsk3 reguliert (Goshima *et al.*, 2003b). Es wurden bis jetzt zwei Phosphorylierungsstellen in Mis12 an Ser190 oder Thr192 und Ser213 in der hydrophilen C-terminalen Region des Proteins gefunden (Goshima *et al.*, 2003b). Diese Region ist auch für die Lokalisierung von Mis12 im Chromatin verantwortlich. Bis jetzt wurde die Regulierung von Mis12 über Phosphorylierung und Dephosphorylierung nicht in

Abhängigkeit vom Zellzyklusstadium untersucht. Die gezielte Mutation von möglichen Phosphorylierungsstellen im humanen Mis12-Homolog und die erneute Analyse der Beweglichkeit eines so mutierten hMis12-Proteins in Abhängigkeit vom Zellzyklus könnten die nächsten Schritte sein, um den Mechanismus der Immobilisierung von hMis12 während der Mitose aufzuklären.

5.1.4 Stabile Bindung als Erweiterung des Konzeptes der nukleären Dynamik

Im Konzept der nukleären Dynamik sind alle bisher untersuchten chromatin-bindenden Komplexe sehr dynamisch und ihre Komponenten durchqueren diffusibel den Zellkern „auf der Suche“ nach der richtigen Bindungsstelle (Misteli, 2001a). Sie bleiben typischerweise nur für wenige Sekunden an Chromatin gebunden (Phair *et al.*, 2004; Beaudouin *et al.*, 2006). Dieses dynamische Verhalten scheint bei der Bildung von Proteinkomplexen mit wechselnden Komponenten am Chromatin eine große Rolle zu spielen. Es ermöglicht eine präzise und gleichzeitig flexible Regulierung der Transkription, Chromatinorganisation und Genexpression (Shav-Tal *et al.*, 2006; Houtsmuller und Vermeulen, 2001; Hager *et al.*, 2002). Die hier gezeigten Daten zeigen, dass eine Subpopulation der inneren Kinetochorproteine außerhalb des Centromer-/Kinetochorbereichs ebenfalls diese hohe Mobilität besitzen. Andererseits konnte hier das innere Kinetochor zum ersten Mal als ein chromatin-bindender Multiproteinkomplex identifiziert werden, dessen Komponenten nicht schnell mit der löslichen Fraktion im Nukleoplasma ausgetauscht werden, sondern sehr stabil in diesem Komplex gebunden bleiben. Die Bindung von CENP-A, einer Subpopulation von CENP-B, CENP-C und CENP-I an das Kinetochor ist so stabil, dass sie eine Zellteilung bis in den nächsten Zellzyklus hinein überdauern kann. Ein solches Verhalten wurde bis jetzt nur für Komponenten des Kernporenkomplexes beschrieben (Rabut *et al.*, 2004).

Diese Daten erweitern das bisherige Konzept der dynamischen Interaktion von Zellkernproteinen mit Chromatin (Misteli, 2005). Neben den gut untersuchten Komplexen mit hohen Austauschraten der Untereinheiten und dem Ziel der Feinregulation durch strukturelle Flexibilität (Transkriptions-, Replikations-, Reparatur-Komplexe) gesellt sich nun im Kontrast dazu das Kinetochor mit äußerst niedrigen Austauschraten bestimmter Untereinheiten und dem Ziel, eine strukturell rigide Entität auf jedem Chromosom zu erzeugen. Dennoch bleibt das Centromer dabei durch dynamische Bindekomponenten wie hMis12 funktionell flexibel.

5.2 Mobilität von PML im Zellkern

Die Existenz von verschiedenen Isoformen des PML-Proteins suggeriert eine strukturelle und funktionelle Heterogenität der Kernkörperchen, der bislang wenig Aufmerksamkeit zu Teil wurde. Von den sechs Zellkern-lokalisierten PML-Isoformen (Jensen et al., Oncogene 2001) konnte gezeigt werden, dass alle sowohl in verschiedenen Zelllinien als auch in primären Zellen identisch reguliert und exprimiert werden (Condemine *et al.*, 2006). Bis zur Aminosäure 552 sind alle PML-Isoformen identisch. Dieser N-Terminus besteht aus den Exonen 1-6 und enthält das „RBCC/TRIM-Motiv“, das sich aus einer „RING-Domäne“, zwei „B-Boxen“ und einer „Coiled-coil-Domäne“ zusammensetzt (s. Abb. 1.4). Alle drei Domänen tragen individuell zur Homooligomerisierung und/oder Bildung von PML-Kernkörperchen bei (Jensen et al., 2001). Die PML-Isoformen unterscheiden sich am C-Terminus durch die unterschiedliche Kombination der nachfolgenden Exone 7a, 7b, 8a, 8b, 9 und der Intronsequenz 7ab (Abb. 1.4).

Die Unterschiede am C-Terminus führen wahrscheinlich dazu, dass PML mit unterschiedlichen Partnerproteinen interagieren können. Beispiele sind die Interaktion zwischen PML-II und CBP, PML-III und Ap-1, und die PML-IV Interaktion mit p53, pRB, DAXX und HIPK2 (Alcalay *et al.*, 1998; Zhong *et al.*, 1999; Fogal *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000; Hofmann *et al.*, 2002). Allerdings wurde in diesen Interaktionsstudien die Isoformspezifität nicht gründlich geprüft. Als sicher gilt, dass p53 nur mit PML-IV aber nicht mit anderen Isoformen funktionell interagiert (Fogal et al., 2000). PML Isoform-I wurde kürzlich als die in verschiedenen Geweben am stärksten exprimierte PML-Isoform identifiziert (Condemine *et al.*, 2006; und eigene unpublizierte Daten). Spezifische Interaktionen von nukleären Proteinen mit dieser Isoform wurden bis jetzt allerdings noch nicht nachgewiesen, ebenso wenig wie mit PML-VI. Die verschiedenen Isoformen von PML könnten so nicht nur zur Vielfältigkeit der postulierten Funktionen von PML, sondern auch individuell zur dynamischen Assemblierung von PML-Kernkörperchen beitragen. Um diese Frage zu adressieren wurden in der vorliegenden Arbeit EGFP-markierte Fusionsproteine aller sechs bekannten nukleären PML-Isoformen in Lokalisations-, FRAP-, und FCS-Analysen untersucht.

5.2.1 Lokalisation von EGFP-PML-I bis -VI an PML-Kernkörperchen

Alle exogen exprimierten EGFP-PML-Isoformen zeigten Kolo­kalisierung mit dem endogenen Sp100-Protein welches ebenfalls eine konstitutive Komponente der PML-Kernkörperchen ist (Abschnitt 4.2.2). Da keine Akkumulationen in den Zellkernen der transfizierten Zellen zu sehen sind, in denen nur endogenes Sp100 und kein EGFP-PML zu finden ist, kann man davon ausgehen, dass die eingebrachte EGFP-PML-Isoform gemeinsam mit den endogen vorhandenen PML-Isoformen in die PML-Kernkörperchen eingebaut wird und es keine PML-Kernkörperchen gibt, die nur aus exogenem EGFP-PML bestehen. Dies wurde auch von Beech und Kollegen (2005) beschrieben und ist ein guter Hinweis darauf, dass alle PML-Isoformen in allen PML-Kernkörperchen lokalisiert sind. Die Expression von FLAG-markierten PML-Isoformen (Beech *et al.*, 2005) und auch der hier eingesetzten EGFP-markierten PML-Isoformen kann aber die Anzahl und Form der PML-Kernkörperchen in den Zellkernen der transfizierten Zellen im Vergleich zu untransfizierten Zellen verändern. Während Beech und Kollegen (2005) eine Zunahme der PML-Kernkörperchen nach Transfektion mit den PML-Isoformen PML-II und PML-IV beobachteten, wurde in der vorliegenden Arbeit diese Zunahme in der Anzahl der PML-Kernkörperchen v. a. bei Transfektion mit den EGFP-markierten Isoformen PML-I und PML-IV beobachtet, wobei diese Beobachtung in dieser Arbeit nicht quantifiziert wurde. Exogen eingebrachtes FLAG-PML-II (Beech *et al.*, 2005) verursacht, besonders bei stärkerer Expression, ebenso wie EGFP-PML-II die Bildung von unregelmäßig geformten Akkumulationen. Die Expression von FLAG-PML-III, -V und -VI führt in U2OS-Zellen zu einem geringeren Anstieg der Anzahl der PML-Kernkörperchen (Beech *et al.*, 2005). Das wurde hier auch bei der Expression von EGFP-PML-III, -V und VI beobachtet.

Die sehr ähnlichen Beobachtungen in der Lokalisation der unterschiedlich markierten PML-Isoformen (FLAG-, bzw. EGFP-Markierung) erlauben die Annahme, dass die unterschiedlichen Lokalisationen nicht auf Veränderung des Proteins durch die Markierung beruhen, sondern tatsächlich charakteristisch für die jeweilige PML-Isoform sind. Die unterschiedliche Lokalisation deutet möglicherweise auf verschiedene Gruppen von Interaktionspartnern der PML-Isoformen und unterschiedliche Eigenschaften bei der Bildung der PML-Kernkörperchen hin. Für Lebendzell-Analysen wurden nur Zellen mit sehr geringer EGFP-PML-Expression ausgewählt, um Überexpressionsartefakte zu minimieren.

5.2.2 Individuelle Austauschraten von Isoformen als Grundlage für eine dynamische Struktur und Funktion von PML-Kernkörperchen

Auf Basis der hier gezeigten FRAP-Analysen können die PML-Isoformen in drei Mobilitäts-Gruppen eingeteilt werden. Der schnellste Austausch an PML-Kernkörperchen wurde für PML-I gemessen ($t_{1/2} = 300 \pm 100$ Sekunden), gefolgt von der Gruppe PML-II, PML-III, PML-IV und PML-VI ($t_{1/2}$ zwischen 380 Sekunden und 440 Sekunden). PML-IV besitzt neben dem Exon 7a die Exone 8a und 8b, während PML-II und PML-III am N-Terminus die Exone 7a und 7b aufweisen. Bei PML-III werden Exon 7a und 7b zusätzlich durch eine kurze Intronsequenz 7ab getrennt. PML-II besitzt einen viel größeren Abschnitt von Exon 7b als PML-III und ist mit 829 Aminosäuren nach PML-I die zweitgrößte Isoform. Dieser größere Abschnitt von Exon 7b könnte für die diffusere Lokalisation dieser Isoform an den PML-Kernkörperchen verantwortlich sein, die bei den Koloalisationsstudien in der vorliegenden und der Arbeit von Beech und Kollegen (2005) beobachtet wurde. Da der N-Terminus aller PML-Isoformen identisch ist, sind ihre individuellen Austauschraten an PML-Kernkörperchen auf die unterschiedlichen Exon-Zusammensetzungen am C-Terminus zurückzuführen.

PML V zeigte die langsamste Austauschrate ($t_{1/2} \sim 30$ min). Ausserdem zeigte die FRAP-Kurve von PML V einen monophasischen Verlauf, d.h. diese Isoform assoziiert und dissoziiert an PML-Kernkörperchen kontinuierlich und mit konstanter Kinetik. PML-V besitzt das Exon 7a, sowie die Intronsequenz 7ab. Dieser kurze C-Terminus scheint einen besonders stabilen Einbau von PML-V in die PML-Kernkörperchen zu unterstützen. Dies legt den Schluß nahe, dass PML V möglicherweise ausschließlich strukturelle Funktionen bei der Assemblierung von PML-Kernkörperchen ausübt.

Die FRAP-Kurven der übrigen Isoformen sind biphasisch mit einem schnellen Anstieg in den ersten 10 min, gefolgt von einem langsameren Anstieg in der nachfolgenden Zeit. Diese Kinetik indiziert die Existenz von (mindestens) zwei Molekülpopulationen mit unterschiedlichen Assoziationsraten, einer schnellen und einer langsamen. Vor dem Hintergrund des Modells, dass PML-Kernkörperchen Orte für die Assemblierung und/oder Modifikation von bestimmten Proteinkomplexen darstellen (Block *et al.*, 2006), reflektiert die schnelle Population vermutlich PML-Moleküle, die mit diversen Interaktionspartnern (p53, CBP, HIPK-2 etc.) an die Kernkörperchen assemblieren. Die langsamere Fraktion ist fester an PML-Kernkörperchen gebunden, sie hat die gleiche (langsame) Austauschkinetik wie PML V und ist daher möglicherweise zusätzlich strukturell gebend. Da die FRAP-Kurven aller PML-

Isoformen nicht in einem Plateau enden, sondern linear weitersteigen, kann davon ausgegangen werden, dass die komplette PML-Population über einen Zeitraum von längstens einer Stunde (PML V) ausgetauscht wird.

Interessanterweise zeigen die Kinetikdaten der PML-Isoformen Parallelen zu den Austauschraten von Komponenten der Cajal-Kernkörperchen. FRAP-Analysen haben gezeigt, dass auch Cajal-Kernkörperchen aus unterschiedlich mobilen Klassen austauschender Komponenten besteht. Während die Cajal-Kernkörperchen Marker-Komponente p80-Coilin relativ lange Verweildauern an dieser Kernstruktur hat (ca. 3 min), tauschen snRNP-Komponenten dort im Sekundenbereich aus (Dundr et al., 2004). Im Gegensatz dazu liegen die Austauschraten der PML-Isoformen an Kernkörperchen, wie hier gezeigt, 1-2 Größenordnungen darüber. Cajal-Kernkörperchen sind folglich in der Austauschdynamik ihrer Komponenten wesentlich schneller.

Erstaunlich war die Beobachtung, dass die mit 560 Aminosäuren kürzeste Isoform PML VI (PML-VI besitzt nur einen Teil von Exon 7a) an Kernkörperchen erheblich schneller austauscht als PML V. Insofern identifizieren die FRAP-Analysen den C-terminalen Bereich von PML V als eine mögliche neue Retentions-Domäne. In den Kolokalisationsexperimenten gehörte EGFP-PML-V, wie auch EGFP-PML-III und EGFP-PML-VI, zu den PML-Isoformen, deren Expression nicht zur vermehrten Bildung von PML-Kernkörperchen in den transfizierten Zellen führte. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Ergebnisse der FCS-Messungen der EGFP-PML-Isoformen im Nukleoplasma. Während EGFP-PML-I bis -IV und EGFP-PML-VI Diffusionskoeffizienten zwischen 1,02 und 1,85 $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ haben, liegt der Diffusionskoeffizient von EGFP-PML-V deutlich höher mit 2,79. Außerdem hat EGFP-PML-V den höchsten Anomalieparameter mit 0,57. Diese Werte deuten darauf hin, dass EGFP-PML-V im Nukleoplasma „freier“ diffundiert und weniger stark mit anderen nukleären Strukturen und Proteinkomplexen wechselwirkt.

Bislang wurden FRAP-Analysen mit nicht näher spezifizierten Fluoreszenz-markierten PML-Isoformen publiziert. Diese kamen zu widersprüchlichen Aussagen: Boisvert und Kollegen (2001) beobachteten in FRAP-Experimenten nach 10 Minuten eine sehr geringe Fluoreszenzerholung von GFP-PML in den PML-Kernkörperchen humaner 293-Zellen und ordneten dem Protein eine ausschließlich strukturelle Funktion in den PML-Kernkörperchen zu. Wiesmeijer und Kollegen (2002) beobachteten mit einem EYFP-PML-Konstrukt die

vollständige Fluoreszenzerholung nach 8 bis 9 Minuten in den PML-Kernkörperchen von primären, humanen VH10 Fibroblasten. Sie diskutierten als Ursache für die unterschiedlichen Fluoreszenzerholzeiten die Tatsache, dass sie die FRAP-Messungen in den Zellen bei 37° C durchführten, während die FRAP-Messungen von Boisvert und Kollegen bei Raumtemperatur durchgeführt worden waren (2001). So verlangsamte sich die Fluoreszenzerholung von EYFP-PML sehr stark, wenn Wiesmeijer und Kollegen (2002) die FRAP-Messungen ebenfalls bei 22° C durchführten. Die vorliegende Arbeit bringt die widersprüchlichen publizierten Daten in Einklang, weil die FRAP-Messungen bei 37 °C durchgeführt wurden und die Ergebnisse Isoform-spezifische Austauschraten etablieren.

Die Identifikation einer Strukturkomponente unter den PML-Isoformen, die in erster Linie der Aufrechterhaltung der nukleären Struktur der PML-Kernkörperchen dienen könnte, macht somit auch die PML-Kernkörperchen zu einer nukleären Struktur, ähnlich den in dieser Arbeit ebenfalls untersuchten Centromer-/Kinetochorkomplexen und den Kernporen (Rabut *et al.*, 2004), deren Komponenten zum einen eine hohe Mobilität aufweisen, die große Flexibilität bei der Regulation der nukleären Prozesse erlaubt. Auf der anderen Seite vergrößert das Vorhandensein einer Strukturkomponente unter den PML-Isoformen die Bedeutung der Struktur der PML-Kernkörperchen selbst. So scheint die Stabilität der Struktur der PML-Kernkörperchen neben dem Vorhandensein der unterschiedlichen PML-Isoformen (Flexibilität) eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass an den PML-Kernkörperchen die Regulation der Transkription beeinflusst werden kann (Block *et al.*, 2006). In dieser Arbeit wurden verschiedene Reporterplasmide mit unterschiedlichen viralen Promotoren über PML-Lokalisierungssequenzen zu den PML-Kernkörperchen gebracht. Infolge der Lokalisierung an den PML-Kernkörperchen konnte sowohl transkriptionelle Aktivierung und auch Repression beobachtet werden. Diese Ergebnisse erweitern das Bild von PML-Kernkörperchen als bloße Speicherorte von Proteinen, die bei Bedarf freigesetzt werden können dahin, dass PML-Kernkörperchen Orte aktiver biochemischer Reaktionen darstellen, die den Ablauf dieser Reaktionen entscheidend beeinflussen.

Erst kürzlich wurde ein neues Modell für den Aufbau der PML-Kernkörperchen vorgeschlagen: Shen und Kollegen (2006) konnten zeigen, dass das Protein PML neben den drei bekannten Sumoylierungsstellen ein Motiv für die nicht kovalente Bindung von SUMO1 besitzt. Dieses Motiv spielt offensichtlich beim Aufbau der Struktur der PML-Kernkörperchen eine entscheidende Rolle, in dem es die nicht kovalente Bindung von

SUMO1 der sumoylierten PML-Proteine untereinander ermöglicht und so zum Aufbau der makromolekularen Struktur der PML-Kernkörperchen entscheidend beiträgt.

In diesem Zusammenhang könnte die geringe Mobilität von PML-V ein Hinweis darauf sein, dass in dieser PML-Isoform das neu identifizierte SUMO-Bindungsmotiv, das in Exon 7 liegt, in einer nur für PML-V charakteristischen Domäne am C-Terminus liegt, die die Bindung mit SUMO1 über dieses Motiv stark begünstigt und somit PML-V zur Strukturkomponente der PML-Kernkörperchen macht.

5.3 PML-Kernkörperchen und DNA-Reparatur

Um die funktionelle Rolle von PML-Kernkörperchen bei der DNA-Reparatur zu beleuchten, wurde ihre Lokalisation während der induzierten Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei erfolgreicher DNA-Reparatur PML-Kernkörperchen zu keinem Zeitpunkt der DNA-Reparatur mit Orten von DNA-Schäden räumlich assoziiert sind. Eine räumliche Überlappung wurde lediglich zwischen PML-Kernkörperchen und irreparablen Doppelstrangbrüchen detektiert.

Damit stehen die hier beschriebenen Ergebnisse in starkem Widerspruch zu Literaturdaten (Carbone *et al.*, 2002, Xu *et al.*, 2003, Seker *et al.*, 2003; Boe *et al.*, 2006). Die Unterschiede können ihre Ursache auch in den stark variierenden experimentellen Bedingungen zur Induktion von DNA-Schäden haben. In den Arbeiten, die die starke Kolo-kalisation von PML-Kernkörperchen mit Orten von DNA-Schäden beschreiben, wurden die untersuchten Zellen mit 15 Gray ionisierender Bestrahlung behandelt (Carbone *et al.*, 2002; Xu *et al.*, 2003). Wie hier in einem „Colony-forming-assay“ gezeigt wurde (Abschnitt 4.3.2), ist diese hohe Dosis sowohl für primäre als auch für immortalisierte Zellen letal, da die DNA-Reparatur nicht erfolgreich abgeschlossen werden kann. Auch wird in diesen Arbeiten die Lokalisation von PML-Kernkörperchen und DNA-Schäden erst zu späteren Zeitpunkten nach der Induktion (6-8 h, Xu *et al.*; 8-12 h, Carbone *et al.*) der Schäden beobachtet. Zu diesen späten Zeitpunkten ist die DNA-Reparatur, gemessen an der Anzahl der verbliebenen γ -H2AX-Foci, in mit 2 Gray ionisierender Bestrahlung weniger stark bestrahlten Zellen schon fast abgeschlossen, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte (Abschnitt 4.3.1). In diesen weniger stark bestrahlten Zellen konnte außerdem zu keinem Zeitpunkt nach der Induktion der DNA-Schäden eine signifikante Kolo-kalisation von PML-Kernkörperchen mit γ -H2AX-Foci

beobachtet werden. Diese hier gemachten Beobachtungen legen nahe, dass die Kolokalisation von PML-Kernkörperchen und Orten von DNA-Schäden zu späten Zeitpunkten nach Schädigung der DNA mit einer hohen Dosis ionisierender Bestrahlung nicht mit einer Funktion der PML-Kernkörperchen bei der DNA-Reparatur selber in Zusammenhang steht, sondern dass diese räumliche Assoziation mit Orten irreparabler DNA-Schäden erfolgt. PML-Kernkörperchen könnten somit eher eine Funktion in den einer nicht erfolgreichen DNA-Reparatur nachgeschalteten Prozessen wie zelluläre Seneszenz oder Apoptose haben. Zur Überprüfung dieser These könnte überprüft werden, ob es eine räumliche Assoziation von Orten irreparabler DNA-Schäden mit PML-Kernkörperchen in seneszenten Zellen gibt. Die Akkumulation solcher so genannter „kryptischer“ γ -H2AX-Foci wurde sowohl in seneszenten humanen Zellkulturen als auch in den Zellen gealterter Mäuse beobachtet (Sedelnikova *et al.*, 2004).

In zwei anderen Studien wurde UV-C-Strahlung zur Schädigung der DNA eingesetzt (Seker *et al.*, 2003; Boe *et al.*, 2006). Wieder wurde die Kolokalisation von Orten geschädigter DNA mit PML-Kernkörperchen beobachtet. Auch hier wurden mit 10 bzw 20 J/m² sehr hohe Dosen der sehr energiereichen UV-C-Strahlung eingesetzt. UV-C-Strahlung hat eine Wellenlänge bis zu 280 nm und wird als harte Strahlung bezeichnet. Die energiereiche UV-C Strahlung kann direkte Schäden an DNA und Proteinen, die in diesem Bereich Strahlung absorbieren, verursachen, da die enthaltene Energie groß genug ist, um kovalente chemische Bindungen an Biomolekülen zu brechen (Kuluncsics *et al.*, 1999). Daraus resultiert, dass selbst kleine Dosen dieser Strahlung im Bereich von weniger als 1 J/m² letale Folgen für die Zelle haben (Alapetite *et al.*, 1996). Auch in diesen Studien (Seker *et al.*, 2003; Boe *et al.*, 2006) könnte also die räumliche Assoziation von PML-Kernkörperchen mit Orten von DNA-Schäden eher in Zusammenhang mit irreparablen Schädigungen der DNA und vielleicht sogar auch von Multiproteinkomplexen stehen. Überlebensraten wurden in diesen Studien nicht gezeigt.

Konsistent mit den vorangegangenen Vermutungen berichten Studien, in denen die DNA weniger stark geschädigt wurde, nicht von einer Kolokalisation von PML-Kernkörperchen und Orten geschädigter DNA (Bischof *et al.*, 2001; Davalos *et al.*, 2004; Dellaire *et al.*, 2006). Es konnte auch keine Akkumulation von PML-Kernkörperchen an Orten lokal induzierter DNA-Schäden nach Behandlung der Zellen mit einem UV-A-Mikrostrahl beobachtet werden (Abschnitt 4.3.3; Dellaire *et al.*, 2006). Somit scheint hinreichend widerlegt, dass es nach Induktion von reparablen DNA-Schäden im Laufe der DNA-Reparatur zu einer Kolokalisation von PML-Kernkörperchen und Orten der DNA-Reparatur

kommt. PML-Kernkörperchen üben also offensichtlich keine Funktion bei der DNA-Reparatur über die direkte räumliche Assoziation mit diesen Orten biochemischer Aktivität aus.

Die Kolokalisation von PML-Kernkörperchen und Proteinen, die in die DNA-Reparatur involviert sind, wie hMre11 (Carbone *et al.*, 2002), TopBP1 (Xu *et al.*, 2003), p53 (Seker *et al.*, 2003) wird in fast allen Studien beobachtet. Auch in dieser Arbeit wurde gezeigt, dass NBS1 in etwa 35 % unbehandelter Zellen mit PML-Kernkörperchen lokalisiert (Abschnitt 4.3.4). Die Kolokalisation von NBS1 mit PML-Kernkörperchen könnte zellzyklus-abhängig erfolgen, was in Zell-Synchronisationsversuchen überprüft werden müsste. Die Bestrahlung von U2OS-Zellen mit geringen Dosen ionisierender Strahlung erhöhte im Verlauf des Reparaturprozesses den Anteil der Zellen, die Kolokalisation zwischen den PML-Kernkörperchen und der phosphorylierten Form des DNA-Reparaturproteins NBS1 zeigten, nur gering. Da der Anteil der Kolokalisation zeigenden Zellen auch nicht signifikant kleiner wird, findet wohl auch keine starke Freisetzung des Proteins NBS1 aus den PML-Kernkörperchen statt, wie es für das Reparaturprotein Mre11 beschrieben wurde (Carbone *et al.*, 2002). Bei starker Bestrahlung der Zellen nimmt die Anzahl der Zellen, in denen NBS1 mit den PML-Kernkörperchen kolokalisiert 24 Stunden nach der Bestrahlung drastisch zu, was ebenfalls nicht im Zusammenhang mit der DNA-Reparatur, sondern anderer zellulärer Prozesse wie Seneszenz oder Apoptose geschehen könnte.

Die leichte Zunahme der Anzahl der PML-Kernkörperchen zu einem späteren Zeitpunkt nach Induktion von DNA-Schäden, die nach stärkerer Schädigung permanent erhöht bleibt (Abschnitt 4.3.1, sowie Dellaire *et al.*, 2006; Boe *et al.*, 2006), weist ebenfalls wieder darauf hin, dass die Rolle der PML-Kernkörperchen eher in einem einer erfolglosen DNA-Reparatur nachgeschalteten Prozess zu vermuten ist. Dass PML unter diesen Bedingungen eher in Apoptose involviert ist, ergibt sich aus dem Befund, dass Zellen, in denen PML fehlt, bei starker Bestrahlung nicht in die Apoptose gehen (Wang *et al.*, 1998).

5.4 Ausblick

Die hier durchgeführten Arbeiten liefern neue Einblicke in die Assemblierung und Funktionsweise von zwei unterschiedlichen Zellkernstrukturen, der Centromer-/Kinetochorkomplexe und der PML-Kernkörperchen. Weitere Arbeiten sollten sich nun anschließen, um die durch die neuen Befunde aufgeworfenen Fragen zu beantworten:

(1) Was führt zur außergewöhnlichen Stabilität des inneren Kinetochor-Komplexes?

Es ist davon auszugehen, dass die Stabilität durch multiple, kooperative Interaktionen der Proteine CENP-A, CENP-B, CENP-C, CENP-H und CENP-I zustande kommt. In FRAP-Analysen von Deletionsvarianten müsste überprüft werden, welche Proteindomänen der CENPs stabil in das Kinetochor verankert werden. Mittels RNAi könnte man in FRAP-Experimenten den Einfluss einzelner CENPs auf die Stabilität jedes anderen CENPs untersuchen.

(2) Ändert sich die Stabilität der Kinetochorkomplexes während der Interphase?

In den Langzeit-FRAP-Analysen wurden unsynchronisierte Zellen benutzt. Obwohl die FRAP-Daten keine zu großen statistischen Schwankungen aufwiesen, ist nicht auszuschließen, dass sich die Austauschraten der untersuchten CENPs in G1, S oder G2-Phase des Zellzyklus subtil, aber funktionell signifikant verändern. Dies wurde beispielsweise kürzlich für Cohesin in seiner Funktion als Schwesterchromatid-Verknüpfer gezeigt (Gerlich *et al.*, 2006). Dazu müßten die FRAP-Versuche an CENPs in synchronisierten Zellen wiederholt werden.

(3) Tragen weitere CENPs zur Stabilität von Kinetochoren bei?

Vor kurzem wurden 11 neue Proteine identifiziert, die konstitutiv am Centromer lokalisieren (Foltz *et al.*, 2006; Okada *et al.*, 2006). Analog zu den hier durchgeführten Dynamik-Experimenten sollten die neuen Proteine auf ihre Verweildauern am Kinetochor in lebenden Zellen untersucht werden.

(4) Was sind die Mechanismen der zellzyklus-abhängigen Immobilisierung von hMis12?

Der Prozess der Immobilisierung von hMis12 während der Mitose könnte durch Dynamik-Messungen von hMis12-Mutanten, in denen potenzielle Phosphorylierungsstellen mutiert wurden, untersucht werden.

(5) Tragen weitere PML-Kernkörperchen-Proteine zur Assemblierung dieser Kernstrukturen bei?

FRAP- und FCS-Studien zur Mobilität der weiteren konstitutiven PML-Kernkörperchenkomponenten Sp100, SUMO, Daxx und BLM sollten klären, ob es noch weitere Strukturkomponenten mit geringer Austauschrate an PML-Kernkörperchen gibt. Insbesondere Sp100 könnte eine solche Funktion wahrnehmen, da wir bei Sp100-Depletion durch siRNA auch eine Destabilisierung von PML Kernkörperchen beobachten (eigene unpublizierte Daten). Individuelle Depletion von Sp100, SUMO, DAXX oder BLM durch RNAi gefolgt von PML-FRAP-Messungen sollten hier ein komplettes Bild der Stabilitäts-Einflüsse jeder einzelnen PML-Kernkörperchenkomponente liefern. Selektive Depletion von PML-V (bzw. anderer Isoformen) sollte zudem enthüllen, wie wichtig diese Isoform für die Kernkörperchen-Stabilität ist.

(6) Welche Funktion hat PML bei der DNA-DSB-Reparatur?

Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse klären nicht eindeutig, ob PML funktionell in die DNA-DSB-Reparatur involviert ist. Um dies zu klären muß in RNA-Interferenzexperimenten gegen PML dessen Einfluss auf die Reparaturkinetik oder den Zelltod (Inhibition der Apoptose bei hohen Strahlendosen) untersucht werden.

Literaturverzeichnis

- Alapetite, C., T. Wachter, E. Sage und E. Moustacchi. 1996. Use of the alkaline cometassay to detect DNA repair deficiencies in human fibroblasts exposed to UVC, UVB, UVA and gamma-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 69:359-369.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J, Raff, M., Roberts, K. und Watson, J.D. (2002). Molecular biology of the cell, 4. Auflage. *Garland Science*, New York, USA
- Alcalay, M., L. Tomassoni, E. Colombo, S. Stoldt, F. Grignani, M. Fagiolli, L. Szekely, K. Helin und P. G. Pelicci. 1998. The promyelotic gene product (PML) forms stable complexes with the retinoblastoma protein. *Mol. Cell Biol.* 18:1084-1093.
- Amor, D. J., P. Kalitsis, H. Sumer und K. H. A. Choo. 2004. Building the centromere: from foundation proteins to 3D organisation. *Trends Cell Biol.* 14:359-368.
- Ando, S., H. Yang, N. Nozaki, T. Okazaki und K. Yoda. 2002. CENP-A, CENP-B and CENP-C chromatin complex that contains the I-type alpha-satellite array constitutes the prekinetochore in HeLa cells. *Mol. Cell Biol.* 22:2229-2241.
- Bacia, K. und P. Schwille. 2003. A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy. *Methods.* 29:74-85.
- Bacia, K und P. Schwille. 2006. Fluorescence cross-correlation spectroscopy in living cells. *Nat. Met.* 3:83-89.
- Banks, D. S. und C. Fradin. 2005. Anomalous diffusion of proteins due to molecular crowding. *Biophys. J.* 89:2960-2971.
- Baudendistel, N., G. Müller, W. Waldeck, P. Angel und J Langowski. 2005. Two-hybrid fluorescence cross-correlation spectroscopy detects protein-protein interaction in vivo. *Chemphyschem.* 6:984-990.
- Beech, S.J., K.J. Lethbridge, N. Killick, N. McGlinchey, and K.N. Leppard. 2005. Isoforms of the promyelocytic leukaemia protein differ in their effects on ND10 organization. *Exp Cell Res.* 307:109-117.
- Bekker-Jensen S., C. Lukas, R. Kitagawa, F. Melander, M. B. Kastan, J. Bartek und J. Lukas. 2006. Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J Cell Biol.* 173:195-206.
- Belmont, A.. 2003. Dynamics of chromatin, proteins, and bodies within the cell nucleus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:304-310.

- Bischof, O., S. H. Kim, J. Irving, S. Beresten, N. A. Ellis und J. Campisi. 2001. Regulation and localization of the Bloom syndrome protein in response to DNA damage. *J. Cell Biol.* 153:367-380.
- Black, B. E., D. R. Foltz, S. Chakravarthy, K. Luger, V. L. Jr. Woods und D. W. Cleveland. 2004. Structural determinants for generating centromeric chromatin. *Nature.* 430:578-582.
- Block, G. J., C. H. Eskiw, G. Dellaire und D. P. Bazett-Jones. 2006. Transcriptional regulation is affected by subnuclear targeting of reporterplasmids to PML nuclear bodies. *Mol. Cell Biol.*
- Blower, M. D., B. A. Sullivan und G. H. Karpen. 2002. Conserved organisation of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev. Cell.* 2:319-330.
- Boddy, M. N., K. Howe, L. D. Etkin, E. Solomon und P. S. Freemont. 1996. PIC 1, a novel ubiquitin-like protein which interacts with the PML component of a multiprotein complex that is disrupted in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene.* 13:971-982.
- Boe, S. O., M. Haave, A. Jul-Larsen, A. Grudic, R. Bjerkvig und P. E. Lonning. 2006. Promyelocytic leukaemia nuclear bodies are predetermined processing sites for damaged DNA. *J. Cell Sci.* 119:3284-3295.
- Boisvert, F.-M., M. J. Kruhlak, A. K. Box, M. J. Hendzel und D. P. Bazett-Jones. 2001. The transcription coactivator CBP is a dynamic component of the Promyelocytic Leukemia Nuclear Body. *J. Cell Biol.* 152:1099-1106.
- Campbell, R. E., O. Tour, A. E. Palmer, P. A. Steinbach, G. S. Baird, D. A. Zacharias und R. Y. Tsien. 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:7877-7882.
- Cao, T., K. L. Borden, P. S. Freemont und L. D. Etkin. 1997. Involvement of the rfp tripartite motif in protein-protein interactions and subcellular distribution. *J Cell Sci.* 110:1563-1571.
- Carbone, R., M. Pearson, S. Minucci und P. G. Pelicci. 2002. PML NBs associate with the hMre11 complex and p53 at sites of irradiation induced DNA damage. *Oncogene.* 21:1633-1640.
- Carrero, G., D. MacDonald, E. Crawford, G. de Vries und M. J. Hendzel. 2003. Using FRAP and mathematical modelling to determine the in vivo kinetics of molecular proteins. *Methods.* 29:14-28.
- Chen, D. und S. Huang. 2001. Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J. Cell Biol.* 153:169-176.

- Cimini, D. und F. Degrossi. 2005. Aneuploidy: a matter of bad connections. *Trends Cell Biol.* 15:442-451.
- Cleveland, D. W., Y. Mao und K.F. Sullivan. 2003. Centromeres and Kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell.* 112:407-421.
- Chan, G. K., S. T. Liu und T. J. Yen. 2005. Kinetochore structure and function. *Trends Cell Biol.* 15:589-598.
- Condemine W., Y. Takahashi, J. Zhu, F. Puvion-Dutilleul, S. Guegan, A. Janin und H. de Thé. 2006. Characterization of endogeneous human promyelocytic leukaemia isoforms. *Cancer Res.* 66:6192-6198.
- Dellaire, G., R. Farrall, W. A. Bickmore. 2003. The Nuclear Protein Database (NPD): sub-nuclear localisation and functional annotation of the nuclear proteome. *Nucl. Acids Res.* 31:328-330.
- Dellaire, G. und D. P. Bazett-Jones. 2004. PML nuclear bodies: dynamic sensors of DNA damage and cellular stress. *BioEssays.* 26:963-977.
- Dellaire, G., R. W. Ching, K. Ahmed, F. Jalali, K. C. K. Tse, R. G. Bristow und D. P. Bazett-Jones. 2006. Promyelocytic leukaemia nuclear bodies behave as DNA damage sensors whose response to DNA double-strand breaks is regulated by NBS1 and the kinases ATM, Chk2, and ATR. *J. Cell Biol.* 175:55-66.
- DeLuca, J. G., Y. Dong, P. Hergert, J. Strauss, J. M. Hickey, E. D. Salmon und B. F. McEwen. 2005. Hec1 and Nuf2 are core components of the kinetochore outer plate essential for organising microtubule attachment sites. *Mol. Biol. Cell.* 16:519-531.
- Dittrich, P., F. Malvezzi-Campeggi, M. Jahnz und P. Schwille. 2001. Accessing molecular dynamics in cells by fluorescence correlation spectroscopy. *Biol. Chem.* 382:491-494.
- D'Orazi, G., B. Cecchinelli, T. Bruno, I. Manni, Y. Higashimoto, . Homeodomain-interacting protein kinase-2 phosphorylates p53 at Ser46 and mediates apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 4:11-19.
- Dundr, M., U. Hoffmann-Rohrer, Q. Hu, I. Grummt, L. I. Rothblum; R. D. Phair und T. Misteli. 2002. A kinetic framework for a mammalian RNA polymerase in vivo. *Science.* 298:1623-1626.
- Dundr, M., M. D. Hebert, T. S. Karpova, D. Stanek, H. Xu, K. B. Shpargel, U. T. Meier, K. M. Neugebauer, A. G. Matera und T. Misteli. 2004. Invivo kinetics of cajal body components. *J. Cell Biol.* 163:831-842.

- Dyck, J. A., G. G. Maul, W. H. Miller Jr., J. D. Chen, A. Kakizuka und R. M. Evans. 1994. A novel macromolecular structure is a target of promyelocytic-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell*. 76:333-343.
- Earnshaw, W. C., H. Ratrie und G. Stretten. 1989. Visualization of centromere proteins CENP-B and CENP-C on stable dicentric chromosome in cytological spreads. *Chromosoma*. 98:1-12.
- Earnshaw, W., B. Bordwell, C. Marino und N. Rothfield. 1986. Three human chromosomal autoantigens are recognized by sera from patients with anti-centromere antibodies. *J. Clin. Invest.* 77:426-30.
- Elson, E. L. und D. Magde. 1974. Fluorescence correlation spectroscopy. *Biopolymers*. 13.
- Elson, E. L.. 2001. Fluorescence correlation spectroscopy measures molecular transport in cells. *Traffic*. 2:789-796.
- Everett, R. D., P. Lomonte, T. Sternsdorf, R. v. Driel und A. Orr. 1999. Cell cycle regulation of PML modification and ND10 composition. *J. Cell Sci.* 112:4581-4588.
- Everett, R. D.. 2001. DNA viruses and viral proteins that interact with PML nuclear bodies. *Oncogene*. 20:7266-7273.
- Floerenes, V. A., G. M. Maelandsmo, A. Forus, A. Andreassen, O. Myklebost, O. Fodstad. 1994. MDM2 gene amplification and transcript levels in human sarcomas: relationship to TP53 gene status. *J. Nat. Canc. Institute*. 86:1297-1302.
- Fogal, V., M. Gostissa, P. Sandy, P. Zacchi, T. Sternsdorf, K. Jensen, P. P. Pandolfi, H. Will, C. Schneider und G. DelSal. 2000. Regulation of p53 activity in nuclear bodies by a specific PML isoform. *EMBO J.* 19:6185-6195.
- Fukagawa, T., Y. Mikami, A. Nishihashi, V. Regnier, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, N. Sugata, K. Todokoro, W. Brown und T. Ikemura. 2001b. CENP-H, a constitutive centromere component, is required for centromere targeting of CENP-C in vertebrate cells. *EMBO J.* 20:4603-4617.
- Foltz, D. R., L. E. T. Jansen, B. E. Black, A. O. Bailey, J. R. III Yates und D. W. Cleveland. 2006. The human CENP-A centromeric complex. *Nat. Cell Biol.* 8:458-469.
- Gerlich, D., J. Beaudouin, M. Gebhard, J. Ellenberg und R. Eils. 2001. Four-dimensional imaging and quantitative reconstruction to analyse complex spatiotemporal processes in live cells. *Nat. Cell Biol.* 3:852-855.
- Gerlich, D., B. Koch, F. Dupeux, J.-M. Peters und J. Ellenberg. 2006. Live-Cell Imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication. *Curr. Biol.* 16:1571-1578.

- Görisch, S. M., M. Wachsmuth, C. Ittrich, C. P. Bacher, K. Rippe und P. Lichter. 2004. Nuclear body movement is determined by chromatin accessibility and dynamics. *Proc. Nat. Ac. Sci.* 101:13221-13226.
- Goshima, G., T. Kiyomitsu, K. Yoda und M. Yanagida. 2003. Human centromere chromatin protein hMis12, essential for equal segregation, is independent of CENP-A loading pathway. *J. Cell Biol.* 160:25-39.
- Goshima, G., O. Iwasaki, C. Obuse und M. Ynangida. 2003. The role of Ppe1/PP6 phosphatase for equal chromosome segregation in fission yeast kinetochore. *EMBO J.* 22:2752-2763.
- Grande, M. A., I. van der Kraan, B. van Steensel, W. Schul, H. de Thé, H. T. van der Voort, L. de Jong, and R. van Driel. 1996. PML-containing nuclear bodies: their spatial distribution in relation to other nuclear components. *J. Cell Biochem.* 63:280-291.
- Hager, G. L., C. Elbi und M. Becker. Protein dynamics in the nuclear compartment. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12:137-141.
- Haustein, E. und P. Schwille. 2003. Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy. *Methods.* 29:153-166.
- Heim, R., D. C. Prasher und R. Y. Tsien. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:12501-12504.
- Hemmerich, P und S. Diekmann (Hrsg.). Visions of the nucleus. American scientific publishers.
- Henikoff, S. und Y. Dalal. 2005. Centromeric Chromatin: what makes it unique? *Curr. Op. Gen. Dev.* 15:177-184.
- Hofmann, T. G., A. Möller, H. Sirma, H. Zentgraf, Y. Taya, W. Dröge, H. Will und M. L. Schmitz. 2002. Regulation of p53 activity by its interaction with homeodomain-interacting protein kinase-2. *Nat Cell Biol.* 4:1-10.
- van Hooser, A. A., I. I. Ouspenski, H. C. Gregson, D. A. Starr, T. J. Yen, M. L. Goldberg, K. Yokomori, W. C. Earnshaw, K. F. Sullivan und B. R. Brinkley. 2001. Specification of kinetochore-forming chromatin by the histone H3 variant CENP-A. *J. Cell Sci.* 114:3529-3542.
- Houtgraaf J. H, J. Versmissen und W. J. van der Giessen. 2006. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc Resusc. Med.* 7:165-172.

- Houtsmuller, A. B. und W. Vermeulen. 2001. Macromolecular dynamics in living cell nuclei revealed by fluorescence redistribution after photobleaching. *Histochem. Cell Biol.* 115:13-21.
- Howman, E. V., K. J. Fowler, A. J. Newson, S. Redward, A. C. MacDonald, P. Kalitsis und K. H. A. Choo. 2000. Early disruption of centromeric chromatin organisation in centromere protein A (CENP-A) null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97:1148-1153.
- Hu, P., S. F. Beresten, a. J. v. Brabant, T.-Z. Ye, P. P. Pandolfi, F. B. Johnson, L. Guarente und N. A. Ellis. 2001. Evidence for BLM and Topoisomerase III α interaction in genomic stability. *Hum. Mol. Gen.* 10:1287-1298.
- Hudson, D. F., K. J. Fowler, E. Earle, R. Saffery, P. Kalitsis, H. Trowell, J. Hill, N. G. Wreford, D. M. de Kretser, M. R. Cancilla, E. Howman, L. Hii, S. M. Cutts, D. V. Irvine und K. H. Choo. 1998. Centromere protein B null mice are mitotically and meiotically normal but have lower body and testis weights. *J. Cell Biol.* 141:309-319.
- Irvine, D. V., D. J. Amor, J. Perry, N. Sirvent, F. Pedoutour, K. H. A. Choo und R. Saffery. 2004. Chromosome size and origin determinants of the level of CENP-A incorporation into human centromeres. *Chrom. Res.* 12:805-815.
- Jensen, K., C. Shiels und P. S. Freemont. 2001. PML protein isoforms and the RBCC/TRIM motif. *Oncogene* 20:7223-7233.
- Kentsis, A. und K. L. B. Borden. 2000. Construction of macromolecular assemblages in eukaryotic processes and their role in human disease: linking RINGs together. *Curr. Protein Pept. Sci.* 1:49-73.
- Kiefflich, A., A. von Mikecz und P. Hemmerich. 2002. Cell cycle-dependent association of PML bodies with sites of active transcription in nuclei of mammalian cells. *J. Struct. Biol.* 140:167-179.
- Kimura, H. und P. R. Cook. 2001. Kinetics of core histones in living human cells: little exchange of H3 and H4 and some rapid exchange of H2B. *J. Cell Biol.* 153:1341-1353.
- Kitagawa, K., H. Masumoto, M. Ikeda und T. Okazaki. 1995. Analysis of protein-DNA and protein-protein interactions of centromere protein B (CENP-B) and properties of the DNA-CENP-B complex in the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 15:1602-1612.
- Kline, S. L., I. M. Cheeseman, T. Hori, T. Fukagawa und A. Desai. 2006. The human Mis 12 complex is required for kinetochore assembly and proper chromosome segregation. *J. Cell Biol.* 173:9-17.
- Kops, G. J., B. A. Weaver und D. W. Cleveland. 2005. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat. Rev. Cancer.* 773-785.

- Kuluncsics, Z., D. Perdiz, E. Brulay, B. Muel und E. Sage. 1999. Wavelength dependence of ultraviolet-induced DNA damage distribution: involvement of direct or indirect mechanisms and possible artefacts. *J. Photochem. Photobiol.* 49:71-80.
- Lamond, A. I. und W. C. Earnshaw. 1998. Structure and function in the nucleus. *Science*. 280:547-553.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 327:716-717.
- Lallemand-Breitenbach, V., J. Zhu, F. Puvion, M. Koken, N. Honore, A. Dubeikovsky, E. Duprez, P. P. Pandolfi, E. Puvion, P. Freemont und H. De Thé. 2001. Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As(2)O(3)-induced PML or PML/retinoic acid receptor a degradation. *J. Exp. Med.* 193:1361-72.
- Lanini, L. und F. McKeon. 1995. Domain required for CENP-C assembly at the kinetochore. *Mol. Biol. Cell.* 6:1049-1059.
- Li, D, C. Leo, J. Zhu, X. Wu, J. O'Neil, E. J. Park und J. D. Chen. 2000. Sequestration and inhibition of DAXX-mediated transcriptional repression by PML. *Mol. Cell Biol.* 20:1784-1796.
- Lippincott-Schwartz, J. E. Snapp und A. Kennworthy. 2001. Studying protein dynamics in living cells. *Nat. Rev.* 2:444-456.
- Lippincott-Schwartz, J., N. Altan-Bonnet und G.H. Patterson. 2003. Photobleaching and photoactivation: following protein dynamic in living cell. *Nat. Rev. Imaging Cell Biol.* S7-S14.
- Liu, S. T., J. C. Hittle, S. A. Jablonski, M. S. Campbell, K. Yoda und T. J. Yen. 2003. Human CENP-I specifies localisation of CENP-F, Mad1 and Mad2 to kinetochores and is essential for mitosis. *Nat. Cell Biol.* 5:341-345.
- Liu, S. T., J. B. Rattner, S. A. Jablonski und T. J. Yen. 2006. Mapping the assembly pathways, that specify formation of the trilaminar kinetochore plates in human cells. *J. Cell Biol.* 175:41-53.
- Lukas, C. J. Falck, J. Bartkova, J. Bartek und J. Lukas. Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat. Cell Biol.* 5:255-260.
- Magde, D., E. L. Elson und W. W. Webb. 1974. Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers*. 13:29-61.

- Mangenot, S., S. Keller und J. Radler. 2003. Transport of nucleosome core particles in semidilute DNA solutions. *Biophys. J.* 85:1817-25.
- Masumoto, H., H. Masukata, Y. Muro, N. Nozaki und T. Okazaki. 1989. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoid DNA, a human centromeric satellite. *J. Cell Biol.* 109:1963-1973.
- Medina, M. A. und P. Schwille. 2002. Fluorescence correlation spectroscopy for the detection and study of single molecules in biology. *BioEssays.* 24:758-764.
- Meluh, P. B., P. Yang, L. Glowczewski, D. Koshland und M. M. Smith. 1998. Cse4p is a component of the core centromere of *Sacharomyces cerevisiae*. *Cell.* 94:607-613.
- Mikami, Y., T. Hori, H. Kimura und T. Fukagawa. 2005. The functional region of CENP-H interacts with the Nuf2 complex that localises to centromere during mitosis. *Mol. Cell Biol.* 25:1958-1970.
- Mirzoeva, O. K. und J. H. Petrini. 2001. DNA damage-dependent nuclear dynamics of the Mre11 complex. *Mol. Cell Biol.* 21:281-288.
- Misteli, T., A. Gunjan, R. Hock, M. Bustin und D. T. Brown. 2000. Dynamic binding of Histone H1 to chromatin in living cells. *Nature.* 408:877-881.
- Misteli, T. 2001. Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. *Science.* 291:843-847.
- Misteli, T. 2005. Concepts in nuclear architecture. *BioEssays.* 27:477-487.
- Musacchio, A. und K. G. Hardwick. 2002. The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:731-741.
- Naka, K., K. Ikeda und N. Motoyama. 2002. Recruitment of NBS1 into PML oncogenic domains via interaction with Sp100 protein. *BBRC.* 299:863-871.
- Negorev, D., A. M. Ishov und G. G. Maul. 2000. Evidence for separate ND10-binding and homo-oligomerization domains of Sp100. *J. Cell Sci.* 114:59-68.
- Negorev, D. und G. G. Maul. 2001. Cellular proteins localized at and interacting with ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot. *Oncogene.* 20:7234-7242.
- Nishihashi, A., T. Haraguchi, Y. Hiraoka, T. Ikemura, V. Regnier, H. Dodson, W. C. Earnshaw und T. Fukagawa. 2002. CENP-I is essential for centromere function in vertebrate cells. *Dev. Cell* 2:463-476.
- Obuse, C., O. Iwasaki, T. Kiyomitsu, G. Goshima, Y. Toyoda und M. Yanagida. 2004. A conserved Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HP1 and outer kinetochore protein Zwint-1. *Nat. Cell Biol.* 6:1135-1141.

- Ogg, S. C. und A. I. Lamond. 2002. Cajal bodies and coilin- moving towards function. *J. Cell Biol.* 259:17-21.
- Ohzeki, J., M. Nakano, T. Okada, and H. Masumoto. 2002. CENP-B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA. *J. Cell Biol.* 159:765-775.
- Okada, M., I. M. Cheeseman, T. Hori, K. Okawa, I. X. McLeod, J. R. III Yates, A. Desai und T. Fukagawa. 2006. The CENP-H-I complex is required for the efficient incorporation of newly synthesized CENP-A into centromeres. *Nat. Cell Biol.* 8:446-457.
- Ormo, M., A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien und S. J. Remington. 1996. Crystal structure of the aequorea victoria green fluorescent protein. *Science.* 273:1392-1395.
- Orthaus, S., S. Ohndorf und S. Diekmann. 2006. RNAi knock down of human kinetochore protein CENP-H. *BBRC*. In press.
- Orthaus, S.. 2006. Towards the architecture of the human inner kinetochore. *Dissertation*, Universität Jena
- Page, S. L., W.C. Earnshaw, K. H. A. Choo und L. G. Shaffer. 1995. Further evidence that CENP-C is a necessary component of active centromeres: Studies of a dic(X;15) with simultaneous immunofluorescence and FISH. *Hum. Mol. Gen.* 4:289-294.
- Patterson, G. H., S. M. Knobel, W. D. Sharif, S. R. Kain und D. W. Piston. 1997. Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 73:2782-2790.
- Phair, R. D. und T. Misteli. 2001. Kinetic modelling approaches to in vivo imaging. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:898-907.
- Pidoux, A. L., W. Richardson und R. C. Allshire. 2003. Sim4: a novel fission yeast kinetochore protein required for centromeric silencing and chromosome segregation. *J. Cell Biol.* 161:295-307.
- Politi, V., G. Perini, S. Trazzi, A. Pliss, I. Raska, W. C. Earnshaw und G. Della Valle. 2002. CENP-C binds the alpha-satellite DNA in vivo at specific centromere domains. *J. Cell Sci.* 115:2317-2327.
- Politz, J. C., R. A. Tuft, K. V. Prasanth, N. Baudendistel, K. E. Fogarty, L. M. Lifshitz, J. Langowski, D. L. Spector und T. Pederson. 2006. Rapid diffusional shuttling of poly(A)RNA between nuclear speckles and the nucleoplasm. *Mo. Biol Cell.* 17:1239-1249.

- Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast und M. J. Cormier. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*. 111:229-232.
- Prendergast, F. G.. 1999. Biophysics of the green fluorescent protein. *Methods Cell Biol.* 58:1-18.
- Putkey F. R., T. Cramer, M. K. Morpew, A. D. Silk, R. S. Johnson, J. R. McIntosh und D. W. Cleveland. 2002. Unstable kinetochore-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E. *Dev. Cell*. 3: 351-365.
- Rabut, G., V. Doye und J. Ellenberg. 2004. Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. *Nat. Cell Biol.* 6:1114-1121.
- Rapp, A.. 2004. UV-A induziert DNA Exzisionsreparatur sowie Doppelstrangbruchreparatur in den p53-/- humanen Keratinozyten HaCaT. *Dissertation*, Universität Jena
- Reid, B. G., und G. C. Flynn. 1997. Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry*. 36:6786-6791.
- Rigler, R., Ü. Mets, J. Widengren und P. Kask. 1993. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *Europ. Biophys. J.* 22:169-175.
- Rockel, T. D., D. Stuhlmann und A. v. Mikecz. 2005. Proteasomes degrade proteins in focal subdomains of the human cell nucleus. *J. Cell Sci.* 118:5231-5242.
- Rogakou, E. P., C. Boon, C. Redon und W. M. Bonner. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* 146:905-916.
- Saffery, R., D. V. Irvine, B. Griffiths, P. Kalitsis, L. Wordeman und K. H. Choo. 2000. Human centromeres and neocentromeres show identical distribution patterns of >20 functionally important kinetochore-associated proteins. *Hum. Mol. Genet.* 9:175-185.
- Saxton, M. J.. 2001. Anomalous subdiffusion in fluorescence photobleaching recovery: a Monte Carlo study. *Biophys. J.* 81:2226-2240.
- Schmiedeberg, L., K. Weissart, S. Diekmann, G. M. Hoerste und P. Hemmerich. 2004. High- and low-mobility populations of HP1 in heterochromatin and mammalian cells. *Mol. Biol. Cell.* 15:2819-2833.
- Schmiedeberg, L., S. Weidtkamp-Peters, K. Weissart, A. v. Mikecz und P. Hemmerich. 2005. Discrimination of three Sp100 populations– fluorescence correlation microscopy in living cells. *Application note*, Carl Zeiss Microscopy.

- Schueler, M. G., A. W. Higgins, M. K. Rudd, K. Gustshaw und H. H. Willard. 2001. Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science*. 294:109-115.
- Schwille, P., U. Haupts, S. Maiti und W. W. Webb. 1999. Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. *Biophys. J.* 77:2251-2265.
- Schwille, P.. 2001. Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications. *Cell Biochem. Biophys.* 34:383-408.
- Sedelnikova, O. A., I. Horikawa, D. B. Zimonjic, N. C. Popescu, W. M. Bonner und J. C. Barrett. 2004. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 6:168-170
- Seeler, J. S., A. Marchio, D. Sitterlin, C. Transy und A. Dejean. 1998. Interaction of SP100 with HP1 proteins: a link between the promyelocytic leukemia-associated nuclear bodies and the chromatin compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:7316-7321.
- Seker, H., C. Rubbi, S. P. Linke, E. D. Bowman, S. Garfield, L. Hansen, K. L. B. Borden, J. Milner und C. C. Harris. 2003. UV-C induced DNA damage leads to p53-dependent nuclear trafficking of PML. *Oncogene*. 22:1620-1628.
- Seksek, O., J. Biwersi und A. S. Verkman. 1997. Translational diffusion of macromolecule-sized solutes in cytoplasm and nucleus. *J. Cell Biol.* 138:131-142.
- Shah, J. V., E. Botvinick, Z. Bonday, F. Furnari, M. Berns und D. W. Cleveland. 2004. Dynamics of Centromere and Kinetochore Proteins: implications for checkpoint signaling and silencing. *Curr. Biol.* 14:942-952.
- Shav-Tal, Y. X. Darzacq und R. H. Singer. 2006. Gene expression within a dynamic nuclear landscape. *EMBO J.* 25:3469-3479.
- Shelby, R. D., K. M. Hahn und K. F. Sullivan. 1996. Dynamic elastic behavior of α -satellite DNA domains visualized in situ in living human cells. *J. Cell Biol.* 135:545-557.
- Shelby, R. D., K. Monier und K. F. Sullivan. 2000. Chromatin assembly at kinetochores is uncoupled from DNA replication. *J. Cell Biol.* 151:1113-1118.
- Shen, T. H., H.-K. Lin, P. P. Scaglioni, T. M. Yung und P. P. Pandolfi. 2006. The mechanism of PML-nuclear body formation. *Mol. Cell*. 24:331-339.
- Shiels, C., S. A. Islam, R. Vatcheva, P. Sasieni, M. J. Sternberg, P. S. Freemont und D. Sheer. 2001. PML bodies associate specifically with the MHC gene cluster in interphase nuclei. *J. Cell Sci.* 114:3705-3716.

- Smith, K. P. und J. B. Lawrence. 2000. Interaction of U2 gene loci and their nuclear transcripts with Cajal (coiled) bodies: evidence for PreU2 within Cajal bodies. *Mol. Biol. Cell.* 11:2987-2998.
- Soldatenkov, V. A., Z. A. Trebenok, I. V. Filippovich und S. B. Curtis. 1986. Lethal and potentially lethal lesions induced by radiation--a unified repair model. *Radiat. Res.* 106:252-70.
- Song, K., B. Gronemeyer, W. Lu, E. Eugster und J. E. Tomkiel. 2002. Mutational analysis of the central centromere targeting domain of human centromere protein C (CENP-C). *Exp. Cell Res.* 275:81-91.
- Sporbert, A., A. Gahl, R. Ankerhold, H. Leonhardt und M. C. Cardoso. 2002. DNA Polymerase clamp shows little turnover at established replication sites but sequential de novo assembly at adjacent origin clusters. *Mol. Cell.* 10:1355–1365.
- Sternsdorf, T. M. Gostissa, H. Sirma, G. Del Sal, M. Ruthart, M. L. Schmitz, H. Will, T. G. Hofmann. 2005. Chapter 9– Promyelocytic leukaemia nuclear bodies: cellular function and disease association. aus: *Visions of the nucleus*, Hrsg. P. Hemmerich und S. Diekmann, *American scientific publishers*, USA.
- Strudwick, S., K. L. Borden. 2002. Finding a role for PML in APL pathogenesis: a critical assessment of potential PML activities. *Leukemia.* 16:1906–1917.
- Su, T. T.. Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices. *Annu. Rev. Genet.* 40:187-208.
- Sugata, N., S. Li, W. C. Earnshaw, T. J. Yen, K. Yoda, H. Masumoto, E. Munekata, P. E. Warburton und K. Todokoro. 2000. Human CENP-H multimers colocalize with CENP-A and CENP-C at active centromere-kinetochore complexes. *Hum. Mol. Genet.* 9:2919-2926.
- Sugimoto, K., H. Yata, Y. Muro und M. Himeno. 1994. Human centromere protein C (CENP-C) is a DNA-binding protein which possesses a novel DNA-binding motif. *J. Biochem.* 116:877-881.
- Sugimoto, K., R. Fukuda und M. Himeno. 2000. Centromere/kinetochore localisation of human centromere protein A (CENP-A) exogenously expressed as a fusion to green fluorescent protein. *Cell. Struct. Funct.* 25:253-261.
- Sugimoto, K., K. Kuriyama, A. Shibata und M. Himeno. 1997. Characterization of internal DNA-binding and C-terminal dimerisation domains of human centromere/kinetochore autoantigen CENP-C in vitro: role of DNA-binding and self-associating activities in kinetochore organization. *Chrom. Res.* 5:132-141.

- Sullivan, K. F., M. Hechenberger und K. Masri. 1994. Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *J. Cell Biol.* 127:581-592.
- Sullivan, B. A., M. D. Blower und G. H. Karpen. 2001. Determining centromere: cyclical stories and forking paths. *Nature Review* 2:584–589.
- Suzuki, N., M. Nagano, N. Nozaki, S. Egashira, T. Okazaki und H. Masumoto. 2004. CENP-B interacts with CENP-C domains containing Mif2 regions responsible for centromere localization. *J. Biol. Chem.* 279:5934-5946.
- Swaminathan, R., C. P. Hoang und A. S. Verkman. 1997. Photobleaching recovery and anisotropy decay of green fluorescent protein GFP-S65T in solution and cells: cytoplasmic viscosity probed by green fluorescent protein translational and rotational diffusion. *Biophys. J.* 72:1900-1907.
- Tanaka, Y., H. Tachiwana, K. Yoda, H. Masumoto, T. Okazaki, H. Kurumizaka und S. Yokoyama. 2005. Human centromere protein B induces translational positioning of nucleosomes on alpha-satellite sequences. *J. Biol. Chem.* 280:41609-41618.
- Tomkiel, J., C. A. Cooke, H. Saitoh, R. L. Bernat und W. C. Earnshaw. 1994. CENP-C is required for maintaining proper kinetochore size and for a timely transition to anaphase. *J. Cell Biol.* 125:531-545.
- Trazzi, S., R. Bernardoni, D. Diolaiti, V. Politi, W. C. Earnshaw, G. Perini und G. D. Valle. 2002. In vivo molecular dissection of human inner kinetochore protein CENP-C. *J. Struct. Biol.* 140:39-48.
- Tseng, S. und J. P. Hsu. 1990. A kinetic analysis of the repair of radiation-induced DNA double-strand breaks. *Radiat. Res.* 122:333-336.
- Tsien, R.Y.. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67:509-544.
- Verreault, A. 2003. Histone deposition at the replication fork: a matter of urgency. *Mol. Cell.* 11:283-284.
- Verschure, P.. 2006. Chromosome organization and gene control: it is difficult to see the picture when you are inside the frame. *J Cell. Biochem.* 99:24-35.
- Wang, Z. G., D. Ruggero, S. Ronchetti, S. Zhong, M. Gaboli, R. Rivi und P. P. Pandolfi. 1998. PML is essential for multiple apoptotic pathways. *Science.* 20:266-272.
- Weidemann, T., M. Wachsmuth, T. A. Knoch, G. Müller, W. Waldeck und J. Langowski. 2003. Counting nucleosomes in living cells with a combination of fluorescence correlation spectroscopy and confocal imaging. *J. Mol. Biol.* 334:229-240.

- Weidtkamp-Peters, S., H.-P. Rahn, M. C. Cardoso und P. Hemmerich. 2006. Replication of centromeric heterochromatin in mouse fibroblasts takes place in early, middle, and late S phase. *Histochem Cell Biol.* 125:91–102.
- Weis, K., S. Rambaud, C. Lavau, J. Jansen, T. Carvalho, M. Carmo-Fonseca, A. Lamond und A. Dejean. 1994. Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukaemia cells. *Cell.* 76:345-356.
- Wieland, G., S. Orthaus, S. Ohndorf, S. Diekmann und P. Hemmerich. 2004. Functional complementation of human centromere Protein A (CENP-A) by Cse4 from *S. cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 24:6620-6630.
- Wouters, F. S., P. J. Verveer und P. I. Bastiaens. 2001. Imaging biochemistry in living cells. *Trends Cell Biol.* 11:203-211.
- Xu, Z. X., A. Timanova-Atanasova., R. X. Zhao und K. S. Chang. 2003. PML colocalizes with and stabilizes the DNA damage response protein TopBP1. *Mol. Cell. Biol.* 23:4247-4256.
- Yang, C. H., J. Tomkiel, H. Saitoh, D. Johnson und W.C. Earnshaw. 1996. Identification of overlapping DNA-binding and centromere-targeting domains in the human kinetochore protein CENP-C. *Mol. Cell Biol.* 16:3576-3586.
- Yang, F., L. G. Moss und G. N. Phillips Jr.. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 14:1246-1251.
- Zeitlin, S.G., S. Patel, B. Kavli und G. Slupphaug. 2005. Xenopus CENP-A assembly into chromatin requires base excision repair proteins. *DNA Repair* 4:760-772.
- Zinkowski, R.P., J. Meyne, and B.R. Brinkley. 1991. The centromere-kinetochore complex: a repeat subunit model. *J. Cell Biol.* 113:1091-1110.
- Zhang, Y., Z. Junqing und C. U. K. Lim. 2006. The role of NBS1 in DNA double strand break repair, telomere stability, and cell cycle checkpoint control. *Cell Res.* 16:45-54.
- Zhong, S., Hu, P., Ye, T. Z., Stan, R., Ellis, N. A. and Pandolfi, P. P. 1999. A role for PML and the nuclear body in genomic stability. *Oncogene* 18:7941-7947.
- Zhong, S., S. Müller, S. Ronchetti, P. S. Freemont, A. Dejean und P. P. Pandolfi. 2000. Role of SUMO-modified PML in nuclear body formation. *Blood.* 95:2748-2752.
- Zhu, J., M. H. Koken, F. Quignon, M. K. Chelbi-Alix, L. Degos, Z. Y. Wang, Z. Chen und H. de Thé. 1997. Arsenic-induced PML targeting onto nuclear bodies: implications for treatment of acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl. Acad. Sci.* 94:3978-3983.

Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen und Diagramme

Abb. 1.1:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen verschiedener nukleärer Strukturen in humanen Zellen	4
Abb. 1.2:	Struktur des humanen Centromer-/Kinetochorkomplex	5
Abb. 1.3:	Die Funktionen der PML-Kernkörperchen	9
Abb. 1.4:	Die Isoformen des PML-Proteins	10
Abb. 1.5:	FRAP-Messungen an subnukleären Strukturen im Zellkern	16
Abb. 1.6:	FCS-Messungen im Nukleoplasma	18
Abb. 4.1:	Lokalisation der EGFP-Fusionsproteine von CENP-A, -B und -C während der Interphase und Mitose in HEp-2-Zellen	41
Abb. 4.2:	Lokalisation der EGFP-Fusionsproteine von CENP-H, -I und hMis12 während der Interphase und Mitose in HEp-2-, bzw. HeLa-Zellen	42
Abb. 4.3:	FRAP-Messungen in EGFP-CENP-A, -CENP-B und -CENP-C exprimierenden HEp-2-Zellen in Interphase und Mitose	45
Abb. 4.4:	FRAP-Messungen in EYFP-CENP-H exprimierenden HeLa-Zellen, bzw. EGFP-CENP-I und -hMis12 exprimierenden HEp-2-Zellen in Interphase und Mitose	46
Abb. 4.5:	Quantitative Auswertung der FRAP-Messungen in der Interphase und Mitose	47
Abb. 4.6:	Domänenstruktur der Kinetochorproteine CENP-B und CENP-C	49
Abb. 4.7:	Lokalisation und Dynamik der Deletionsvarianten von CENP-B und CENP-C	50
Abb. 4.8:	Langzeit-FRAP-Messungen in EGFP-CENP-A-, EGFP-CENP-B-, EGFP-CENP-C, EYFP-CENP-H und EGFP-CENP-I-exprimierenden HEp-2-Zellen in der Interphase	53
Abb. 4.9:	FCS-Messungen in lebenden humanen Zellen	56
Abb. 4.10:	Western Blot der transient in U2OS-Zellen exprimierten EGFP-Fusionsproteine der PML-Isoformen I-VI	59
Abb. 4.11:	Lokalisation der EGFP-PML-Isoformen in U2OS-Zellen	60
Abb. 4.12:	Quantitative Auswertung der FRAP-Messungen der Fusionsproteine EGFP-PML-I bis -VI in U2OS-Zellen	63
Abb. 4.13:	Fluoreszenzzerholung der verschiedenen PML-Isoformen an den PML-Kernkörperchen im Vergleich	64
Abb. 4.14:	FCS-Messungen der EGFP-markierten PML-Isoformen im Nukleoplasma lebender U2OS-Zellen	66

Abb. 4.15:	Kolokalisation von γ H2AX-Foci und PML-Kernkörperchen nach Bestrahlung mit 2 Gray in U2OS-Zellen	68
Abb. 4.16:	Kolokalisation von γ -Foci und PML-Kernkörperchen nach Bestrahlung mit 15 Gray in U2OS-Zellen	69
Abb. 4.17:	Anzahl der γ -H2AX-Foci nach 24h	71
Abb. 4.18:	Lokalisation von PML-Kernkörperchen und γ -H2AX-Foci in WI38-Zellen	72
Abb. 4.19:	Assoziation von PML-Kernkörperchen mit γ -H2AX-Foci in WI38-Zellen 24 Stunden nach der Bestrahlung mit 15 Gray	73
Abb. 4.20:	„Colony-forming-assay“ mit U2OS- und WI-38-Zellen nach der Bestrahlung mit 2 Gray oder 15 Gray	74
Abb. 4.21:	Lokalisation der PML-Kernkörperchen und des phosphorylierten NBS1 in Zellkernen von HEP-2-Zellen nach Bestrahlung mit einem UV-A-Mikrostrahl	75
Abb. 4.22:	Lokalisation des DNA-Reparaturproteins pNBS1 und der PML-Kernkörperchen in U2OS-Zellen nach der Bestrahlung mit 2 Gray, bzw. 15 Gray	77
Diagr. 4.1:	Quantitative Auswertung zur Kolokalisation von PML-Kernkörperchen und pNBS1 in U2OS-Zellen	78
Tabelle 4.1:	Übersicht über das dynamische Verhalten der EGFP-Fusionsproteine des inneren Kinetochors in der Interphase und der Mitose an den Centromeren	54
Tabelle 4.2:	Übersicht über das dynamische Verhalten der EGFP-Fusionsproteine des inneren Kinetochors im Nukleoplasma in der Interphase	57

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

%	Prozent
A	Amper
Abb.	Abbildung
AOTF	Acousto-optic tunable Filter
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CAD	“CENP-A-nucleosome distal centromere components”
cDNA	komplementäre DNA
CENP	Centromerprotein
Da	Dalton
DAPI	4, 6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DSB	DNA-Strangbruch
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	„enhanced GFP”
EtOH	Ethanol
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie, fötales Kälberserum
FCCS	Fluoreszenzkreuzkorrelationsspektroskopie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FRAP	„Fluorescence recovery after photobleaching“
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²); Gramm
GFP	grünfluoreszierendes Protein
Gl.	Gleichung
IF	immobiler Fraktion
³ H	Tritium
h	Stunde
k	kilo
kb	Kilobasenpaar(e)
l	Liter
LSM	„Laser scanning microscope“
μ	mikro-
m	milli-
M	Molar
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
n	nano-
NAC	“CENP-A nucleosome associated complex”
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PML	Promyelotzytische Leukämie
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
ToPro3	monomerischer Cyanin Farbstoff

Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

Veröffentlichungen

Publikationen

Schmiedeberg, L., S. Weidtkamp-Peters, K. Weisshart, A. v. Mikecz und P. Hemmerich. 2005. Discrimination of three Sp100 populations– fluorescence correlation microscopy in living cells. *Application note*, Carl Zeiss Microscopy.

Weidtkamp-Peters, S., H.-P. Rahn, M. C. Cardoso und P. Hemmerich. 2006. Replication of centromeric heterochromatin in mouse fibroblasts takes place in early, middle, and late S phase. *Histochem Cell Biol.* 125:91–102.

Weidtkamp-Peters, S., P. Hemmerich, C. Hoischen, L. Schmiedeberg, I. Erliandri und S. Diekmann. Centromere maintenance through stable binding of inner kinetochore protein CENP-A, CENP-B, CENP-C and CENP-I. Resubmission process, *J. Cell Biol.*

Weidtkamp-Peters, S., D. Negorev, G. G. Maul, N. Gerstner, T. Hofmann, C. Hoischen und P. Hemmerich. PML nuclear body assembly in living cells. Manuskript in Vorbereitung.

Weidtkamp-Peters, S., A. Rapp und P. Hemmerich. Function of PML in DNA double strand repair. Manuskript in Vorbereitung.

Vorträge

Weidtkamp-Peters, S. Analyse des Replikationszeitpunktes von Centromer-DNA in Wirbeltierzellen. Gastvortrag am Biozentrum der Universität Würzburg, Abteilung Zell- und Entwicklungsbiologie, Prof. M.-C. Dabauvalle, April 2003

Weidtkamp-Peters, S.. Replication of centromeric heterochromatin in mouse fibroblasts. Nachwuchsforschertagung der DGZ, Jena, September 2003

Weidtkamp-Peters, S.. Dynamic behavior of the PML nuclear body component Sp100. Gastvortrag am DKFZ, Abteilung Prof. J. Langowski, Heidelberg, April 2004

Weidtkamp-Peters, S.. Kinetische Mikroskopie in der Zellkernforschung. VBMF Methoden-Kolloquium "Kinetische Mikroskopie in der Zellkernforschung", Jena, April 2005

Weidtkamp-Peters, S.. Dynamic behavior of human kinetochore proteins. Workshop on Cell Biology and Microscopy, Altleiningen, Dezember 2005

Weidtkamp-Peters, S.. Assessing kinetics of centromere assembly in living cells using FRAP and FCS. VBMF Methoden-Kolloquium "Kinetic Microscopy: in vivo analysis of subcellular structures", Jena, April 2006

Weidtkamp-Peters, S.. Centromere assembly through highly immobile and some mobile foundation kinetochore proteins. International Symposium: Optical analysis of nanomolecular machines, Max-Delbrück-Centrum Berlin, Juli 2006

Weidtkamp-Peters, S.. In vivo dynamics of PML nuclear body components. Gastvortrag am Kirchhoff-Institut für Physik, Abteilung Prof. C. Cremer, Heidelberg, Juli 2006

Posterbeiträge

Weidtkamp-Peters, S., H. P. Rahn, M. C. Cardoso und P. Hemmerich. Replication of centromeric heterochromatin in mouse fibroblasts. Nachwuchsforschartagung der DGZ, Jena, September 2003

Weidtkamp-Peters, S., D. Negorev, L. Schmiedeberg und P. Hemmerich. Dynamic behavior of the PML nuclear body component Sp100. FCS-Workshop, Dresden, Oktober 2004

Weidtkamp-Peters, S., D. Negorev, L. Schmiedeberg und P. Hemmerich. Dynamic behavior of the PML nuclear body component Sp100. Wilhelm-Bernhard-Workshop, Abtei Münsterschwarzach, September 2005

Weidtkamp-Peters, S., P. Hemmerich, C. Hoischen, L. Schmiedeberg, I. Erliandri und S. Diekmann. Dynamic behaviour of human kinetochore proteins. Workshop on Cell Biology and Microscopy, Altleiningen, Dezember 2005

Weidtkamp-Peters, S., P. Hemmerich, C. Hoischen, L. Schmiedeberg, I. Erliandri und S. Diekmann. Centromere assembly through highly immobile and some mobile foundation kinetochore proteins. International Symposium: Optical analysis of nanomolecular machines, Max-Delbrück-Centrum, Berlin, Juli 2006

Weidtkamp-Peters, S., P. Hemmerich, C. Hoischen, L. Schmiedeberg, I. Erliandri und S. Diekmann. Centromere assembly through highly immobile and some mobile foundation kinetochore proteins. Konferenz: Dynamic organization of nuclear function. Cold Spring Harbor Laboratory, USA, September 2006

Lebenslauf

Persönliche Daten: Stefanie Katrin Weidtkamp-Peters, geb. Weidtkamp
geboren am 24.12.1974 in Moers,
verheiratet mit Enno Peters,
1 Kind (Jonte Henrik, geb. am 27.09.1997)

Anschrift: Markt 8
07743 Jena

Schulausbildung:

09/1981-	07/1985	Städt. Grundschule, Moers
09/1985-	06/1994	Städt. Gymnasium Adolfinum in Moers, mit Abschluss Abitur

Studium:

09/1994-	03/2003	Studium an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, Fachrichtung Biologie, Hauptfach: Zell- und Entwicklungsbiologie, Nebenfächer: Genetik, Biochemie, Immunologie/Virologie
09/1997-	03/2001	verlängerte Erziehungs- und Betreuungsphase wegen der Gehörlosigkeit unseres Sohnes Jonte
04/2002-	02/2003	Diplomarbeit am IMB Jena e.V., Abteilung Molekularbiologie, Arbeitsgruppe Dr. P. Hemmerich, Thema: „Analyse des Replikationszeitpunktes von Centromer-DNA in Wirbeltierzellen“
	seit 04/2003	Doktorandin am Leibniz-Institut für Altersforschung, Fritz-Lipman-Institut Jena e.V. (ehemals IMB Jena), ebenfalls Arbeitsgruppe Dr. P. Hemmerich, Untersuchungen zur Dynamik von Zellkernproteinen

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist, ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe und alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und benutzten Quellen angegeben habe.

Alle Personen, die mich bei Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben, habe ich benannt.

Ich habe nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen.

Dritte Personen haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Sie wurde ebenso auch nicht als Dissertation bei einer anderen Hochschule eingereicht.

Jena, den 10. November 2006

Stefanie Weidtkamp-Peters

Danksagung

Ich möchte mich bedanken...

bei PD Dr. Peter Hemmerich für die gute wissenschaftliche Betreuung und große Unterstützung während der ganzen Zeit, für die Förderung und den Freiraum zu selbständigem Arbeiten und auch für die Möglichkeit, dass ich die Familie der Zellkernforscher kennen lernen konnte, so dass ich mich jetzt für die Zukunft ganz gut gerüstet fühle.

bei Prof. Stephan Diekmann als Leiter der Abteilung Molekularbiologie am FLI für viel Freiheit bei der Arbeit, die ich auch als Erziehung zur Selbständigkeit empfunden habe, und die immer vorhandene Diskussionsbereitschaft und ansteckende Begeisterungsfähigkeit für die „spannenden Themen“.

bei Dr. Christian Hoischen für die meisterhaften Jonglagen mit den vielen G's, T's, A's und C's, die unsere Lieblingsproteine in fast allen Farben des Regenbogens zum Leuchten brachten und damit erst unsere erfolgreiche Arbeit am Mikroskop ermöglichten. Außerdem bedanke ich mich für die zahlreichen Mitfahrgelegenheiten mit netten Gesprächen von der Schule zum Labor, vom Labor in die Stadt, vom Labor zur Schule...

bei den beiden Alumni der PML-Gruppe, Dr. Almut Kießlich und Dr. Lars Schmiedeberg, für ihre große Hilfe im Laboralltag, vor allem bei Lars für die gute Einführung in die Lebendzellmikroskopie,

und bei den beiden aktuellen Mitgliedern, Sandra Münch und Tobias Ulbricht, für ihre Hilfsbereitschaft und das gute Arbeitsklima, das zu jeder Zeit in unserer kleinen Gruppe herrschte.

bei allen anderen Mitarbeitern der Abteilung Molekularbiologie für die gute Zusammenarbeit, besonders bei Sabine Ohndorf, Marianne Koch und Sylke Pfeiffer für ihre Unterstützung bei Plasmid-Präparationen und Western Blots, bei Sandra Orthaus für die gegenseitige Unterstützung und manche Rückenstärkung auf unserem gemeinsamen Weg seit der Diplomarbeit, bei Christiane Hirsch für die Hilfe beim „Papierkram“, sowie bei Norman Gerstner für die Assistenz bei den PML-Isoformen-FRAP's.

bei Andrea Herold und bei Anna Sasse für ihre Unterstützung und Freundschaft.

Ganz besonders danke ich meiner Familie: meinen Schwestern Ina und Astrid und meinen Eltern für den Rückhalt und ihr Vertrauen und ganz besonders für ihre große Hilfe bei Jontes Betreuung in den Ferienzeiten, oder wenn ich in Sachen Zellkern unterwegs war.

Bei Enno bedanke ich mich für sein Verständnis dafür, wie wichtig mir diese Arbeit ist, und seine Toleranz gegenüber sonntäglichen Laborbesuchen und Vortragsvorbereitungen trotz unserer knapp bemessenen gemeinsamen Zeit in den letzten zwei Jahren, was sich hoffentlich bald ändert.

Mein größter Dank gilt meinem Sohn Jonte, der an vielen Sonntagen mit ins Labor musste und an vielen Abenden geduldig neben mir am Computer gesessen hat (mit der Folge, dass er mittlerweile ein fortgeschrittener Powerpoint-Anwender ist und profunde Zellkulturkenntnisse besitzt), für seine Selbständigkeit und Verlässlichkeit, die mir in unserem Alltag vieles erleichtert hat, und für die Kraft, die er mir jeden Tag gibt.